

Université de Montréal

Biomarqueurs de génotoxicité chez les bélugas et autres mammifères marins

par

Julie Gauthier

Programme des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue d'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Octobre, 1998

© Julie Gauthier, 1998



W
4
U58
1999
V. 106

(Université de Montréal)

Manuscrits de genre scientifique des belges et autres manuscrits belges



Université de Montréal

Programme des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Ph.D. (Ph.D.)
en sciences biomédicales



1999

© Université de Montréal, 1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Biomarqueurs de génotoxicité chez les bélugas et autres mammifères marins

présentée par:

Julie Gauthier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Marcel Cadotte.....président du jury
Dr Éric Rassart.....directeur de recherche
Dr Hélène Dubeau.....co-directrice de recherche
Dr Nicole Lemieux.....membre du jury
Dr Michel Fournier.....examineur externe
Dr Jean Vacher.....représentant du doyen

Thèse acceptée le: 15 janvier 1999.

SOMMAIRE

Les bélugas du St-Laurent ainsi que d'autres populations de mammifères marins sont exposés à des concentrations élevées de polluants environnementaux qui ont été associés au cancer et à différents problèmes de santé. Des événements induits par les contaminants environnementaux, tels que l'induction tumorale, la promotion tumorale et l'immunosuppression, ont été proposés pour expliquer l'incidence élevée de cancer chez les bélugas du St-Laurent. Les lésions chromosomiques sont des indicateurs d'exposition à des agents génotoxiques et jouent un rôle important dans l'induction et la promotion tumorales. Certains des polluants retrouvés dans les tissus ou l'environnement des mammifères marins, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), le chlorure de méthyle mercure (MeHg), le toxaphène et certains autres organochlorés (OCs), sont cancérigènes et génotoxiques au niveau chromosomique dans les cellules de mammifères exposées *in vitro* et *in vivo*.

Les objectifs de ce projet consistent à mettre au point des techniques de détection de lésions chromosomiques dans les cellules de mammifères marins, à évaluer la sensibilité *in vitro* des cellules de bélugas aux effets génotoxiques de divers contaminants environnementaux et à déterminer les fréquences de lésions chromosomiques retrouvées *in vivo* chez les bélugas et autres mammifères marins appartenant à des populations peu exposées aux polluants environnementaux. Cette démarche s'inscrit dans un objectif à plus long terme visant à mettre en évidence un accroissement de ces fréquences chez des individus de même espèce appartenant à des populations fortement exposées.

Cette thèse sous forme d'articles est subdivisée en sept chapitres:

Le premier chapitre fournit des informations de base sur: *a)* l'histoire naturelle des bélugas, des dauphins à gros nez, des phoques gris et des phoques du Groenland, *b)* la chimie, le métabolisme, les sources, le potentiel cancérigène ainsi que les autres effets toxiques du mercure, des HAPs et des OCs, *c)* la contamination environnementale et ses effets chez les espèces de mammifères marins faisant l'objet de cette étude, *d)* la définition, l'importance, les mécanismes, la spécificité et la sensibilité des essais de mise en évidence d'aberrations chromosomiques (ACs), de micronoyaux (MN) et d'échanges de chromatides soeurs (ECSs) comme biomarqueurs de génotoxicité et la relation de ces événements avec le cancer, *e)* la génotoxicité du mercure, des HAPs et des OCs, et *f)* les études antérieures traitant des lésions à l'ADN chez les mammifères marins.

Le deuxième chapitre présente les points importants de la mise au point des paramètres de culture cellulaire et des techniques de MN, d'ECS et d'AC appliquées aux lymphocytes et/ou aux fibroblastes des mammifères marins utilisés dans cet ouvrage. Ce chapitre présente aussi les résultats de l'établissement de cultures primaires de fibroblastes de bélugas à partir d'échantillons de peau et d'organes d'animaux vivants ou morts. Le taux de succès était de 57.9% et était plus élevé pour les cultures faites à partir de peau que d'organes.

Les troisième, quatrième et cinquième chapitres constitués respectivement des articles I, II et III présentent les résultats des analyses de MN dans les fibroblastes de peau de bélugas exposés *in vitro* au chlorure de mercure (Hg) et au MeHg, au benzo[*a*]pyrène (BP) et à un mélange d'HAP, au toxaphène, au chlordane et au p,p'-DDT, respectivement. Des augmentations significatives de la fréquence de cellules micronuclées (CMNs) avec la dose sont obtenues pour les composés mercuriels et les OCs en absence d'agent

métabolique externe S9 et pour les HAPs en présence de S9. Des augmentations significatives sont observées pour les concentrations de 0.5, 5 et 20 µg/ml de Hg, de 0.05, 0.5 et 2 µg/ml de MeHg et de BP, de 5 et 20 µg/ml du mélange d'HAP, de 0.05, 0.5, 5 et 10 µg/ml de toxaphène, de 2, 5 et 10 µg/ml de chlordane, et de 10 et 15 µg/ml de p,p'-DDT. Même si les résultats de ces études ne prouvent pas que ces composés soient directement impliqués dans l'étiologie du cancer chez les bélugas du St-Laurent, des augmentations dans la fréquence des CMNs sont observées à des concentrations faibles de MeHg, de BP, d'HAPs et de toxaphène, concentrations comparables à celles retrouvées chez certains bélugas du St-Laurent ou dans leur habitat.

Le sixième chapitre constitué de l'article IV porte sur les biomarqueurs de génotoxicité dans les lymphocytes du sang de bélugas, de dauphins à gros nez, de phoques gris et de phoques du Groenland. Ces animaux proviennent de populations relativement peu exposées à une contamination environnementale. La fréquence de CMNs *in vivo* déterminée chez les quatre espèces varie entre 2 et 14/1000 cellules binuclées (BNs). Aucune différence inter-spécifique dans la fréquence des MN n'est observée et ceci est peut-être dû à une exposition similaire aux contaminants environnementaux chez ces animaux. Contrairement aux résultats obtenus pour les bélugas, la fréquence de CMNs est plus élevée chez les femelles que les mâles et est statistiquement reliée à l'âge chez les dauphins à gros nez. Les fréquences d'ECS et d'AC *in vivo* sont déterminées seulement chez les bélugas et varient entre 1 et 15 ECSs/cellule et 8 et 14 ACs/100 cellules, respectivement. Les fréquences d'ECS et d'AC sont similaires entre les sexes et les fréquences d'ACs, mais non d'ECS, sont statistiquement reliées à l'âge. Cette étude démontre que les techniques cytogénétique d'évaluation des MN, des ECSs et des ACs

sont des outils pratiques pour la détection des lésions chromosomiques chez les mammifères marins.

Une discussion de l'ensemble des données *in vitro* et *in vivo* de ce travail fait l'objet du septième chapitre. La conclusion traite des retombées et des perspectives à long terme de ce projet de recherche.

TABLES DES MATIÈRES

	Page
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Liste des annexes	xiii
Liste des articles	xiv
Remerciements	xvi

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Histoire naturelle	1
1.1.1 Le béluga	1
1.1.2 Le dauphin à gros nez	3
1.1.3 Le phoque gris	4
1.1.4 Le phoque du Groenland	6
1.2 Généralités sur les contaminants environnementaux	8
1.2.1 Le mercure	8
1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	10
1.2.3 Les organochlorés (OCs)	13
1.3 Contaminants environnementaux chez les mammifères marins	16

1.4 Détection des lésions chromosomiques	20
1.4.1 Aberrations chromosomiques	22
1.4.2 Micronoyaux	28
1.4.3 Échanges de chromatides sœurs	30
1.4.4 Les lésions chromosomique et le cancer	33
1.5 Génotoxicité du mercure, des HAPs et des OCs	35
1.6 Études antérieures sur les lésions à l'ADN chez les mammifères marins	39
1.7 Objectifs	40
1.8 Choix du type cellulaire et des espèces de mammifères marins	40
1.8.1 Études <i>in vivo</i>	40
1.8.2 Études <i>in vitro</i>	42

CHAPITRE 2

MISE AU POINT DES MÉTHODES

2.1 Lymphocytes	44
2.2 Fibroblastes	51

CHAPITRE 3

ARTICLE I

ANALYSE DES MICRONOYAUX INDUITS PAR LE MERCURE DANS LES FIBROBLASTES DE PEAU DE BÉLUGAS

"Mercury induced micronuclei in skin fibroblasts of beluga whales"

sous presse dans: **Environmental Toxicology and Chemistry**

Abstract	56
Introduction	57
Methods	59
Results	62
Discussion	70
Acknowledgements	76

CHAPITRE 4

ARTICLE II

INDUCTION DE MICRONOYAUX PAR LES HYDROCARBURES

AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES FIBROBLASTES DE PEAU

ISOLÉS DE BÉLUGA

"Micronuclei induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in isolated beluga

whale fibroblasts"

sous press dans: **Cell and Molecular Biology of Marine Mammals. C. Pfeiffer**

(éditeur). Krieger Publishing Co.

Abstract	77
Introduction	78
Methods	81
Results	84
Discussion	89

Acknowledgements	94
------------------------	----

CHAPITRE 5

ARTICLE III

INDUCTION DE MICRONOYAUX PAR DES COMPOSÉS ORGANOCHLORÉS IN VITRO DANS LES FIBROBLASTES DE PEAU DE BÉLUGA

"Induction of micronuclei by organochlorine compounds in vitro in beluga whale
skin fibroblasts"

sous press dans: Mutation Research

Abstract	95
Introduction	96
Methods	98
Results	100
Discussion	107
Acknowledgements	113

CHAPITRE 6

ARTICLE IV

BIOMARQUEURS DE DOMMAGE CYTOGÉNÉTIQUE CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS

"Biomarkers of cytogenetic damage in marine mammals"

soumis dans: Marine Mammal Science

Abstract	114
Introduction	115
Methods	119
Results	125
Discussion	137
Acknowledgements	142

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Évaluation du potentiel génotoxique <i>in vitro</i>	144A
7.2 Évaluation des niveaux de base d'atteintes cytogénétiques	157
CONCLUSION	164
RÉFÉRENCES	167
Annexe 1	xviii

LISTE DES TABLEAUX

	Page
CHAPITRE 1:	
1.1 Concentrations moyennes, minimales et maximales des contaminants environnementaux chez les bélugas du St-Laurent et de l'arctique de l'ouest de la baie d'Hudson	18
CHAPITRE 2:	
2.1 Effet de la concentration cellulaire sur la stimulation par la conA (8 µg/ml) de la prolifération de lymphocytes de rate de deux bélugas	46
2.2 Effet de la concentration de conA sur la stimulation de la prolifération de lymphocytes de rate de bélugas et de lymphocytes du sang de phoques du Groenland	48
2.3 Effet de la concentration de cyt-B sur les lymphocytes du sang de béluga en présence de 4 µg/ml de conA	49
2.4 Caractéristiques des cultures de fibroblastes de bélugas	52
CHAPITRE 3 (ARTICLE I):	
3.1 Distribution of cells with different numbers of nuclei, proliferation index (CBPI) and ANOVA results for beluga whale skin fibroblasts treated <i>in vitro</i> with MMC, Hg and MeHg	64

3.2 Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts treated <i>in vitro</i> with MMC, Hg and MeHg	65
CHAPITRE 4 (ARTICLE II):	
4.1 Distribution of cells with different number of nuclei per 1000 cells and CBPI values for beluga whale skin fibroblasts after <i>in vitro</i> treatment with BP and a PAH-M in the presence of S9 mix	85
4.2 Distribution of MN and total number of MNC per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts after <i>in vitro</i> treatment with BP and the PAH-M in the presence of S9 mix	86
CHAPITRE 5 (ARTICLE III):	
5.1 Distribution of cells with different numbers of nuclei per 1000 cells and CBPI values for beluga whale skin fibroblasts after <i>in vitro</i> treatment with MMC, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT	101
5.2 Distribution of cells with different numbers of nuclei per 1000 cells and CBPI values for beluga whale skin fibroblasts after <i>in vitro</i> treatment with BP, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT in the presence of S9 mix	102
5.3 Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts after <i>in vitro</i> treatment with MMC, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT	103

5.4 Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts after <i>in vitro</i> treatment with BP, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT in the presence of S9 mix	104
--	-----

CHAPITRE 6 (ARTICLE IV):

6.1 Data on life history parameters of beluga whales, bottlenose dolphins, harp and grey seals of this study	120
6.2 Frequencies of MNCs and total MN per 1000 BNCs and CBPI values in blood lymphocytes of beluga whales, bottlenose dolphins, harp and grey seals	127
6.3 Mean frequencies of SCEs per cell for a total of 30 cells and PRI values in blood lymphocytes of beluga whales	132
6.4 Mean frequencies of individual categories of CAs and total CAs with and without gaps per 100 cells and MI values in blood lymphocytes of beluga whales	135
6.5 Mean frequencies of total CAs with and without gaps per 100 cells and MI values in blood lymphocytes of female and male beluga whales	136

LISTE DES FIGURES

	Page
CHAPITRE 1:	
1.1 Structure chimique des HAPs et des OCs utilisés dans cet ouvrage	11
1.2 Représentation graphique d'exemples d'ACs telles qu'elles apparaissent en métaphase.	23
1.3 Représentation graphique de l'incorporation différentielle du BrdU dans les chromatides soeurs et la détection des ECSs	32
CHAPITRE 3 (ARTICLE I):	
3.1 Typical binucleated beluga whale skin fibroblast without and with a MN	63
3.2 Effect of 0.1, 1 and 2 µg/ml MMC on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts	66
3.3 Effect of 0.05, 0.5, 5 and 20 µg/ml Hg on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts	68
3.4 Effect of 0.05, 0.5 and 2 µg/ml MeHg on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts	69
CHAPITRE 4 (ARTICLE II):	
4.1 Effect of 0.02, 0.5, 2 and 5 µg/ml BP on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts	87

4.2 Effect of 0.02, 0.1, 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts	88
--	----

CHAPITRE 6 (ARTICLE IV):

6.1 Typical BN lymphocyte without and with a MN from a beluga whale	126
6.2 Effect of age on MNC frequency in lymphocytes of beluga whales and bottlenose dolphins	129
6.3 Example of a second division metaphase spread with SCEs from a beluga whale lymphocyte	131
6.4 Example of a normal first division metaphase ($2n= 44$) from a beluga whale lymphocyte	133
6.5 Examples of chromatid breaks in first division beluga whale lymphocytes	134

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC(s)	aberration(s) chromosomique(s)
ADN	acide déoxyribonucleique
ANOVA	analysis of variance
BP	benzo[a]pyrène
BN	binuclée/binucleated
BrdU	bromodeoxyuridine
CMN(s)	cellule(s) micronuclée(s)
CO ₂	carbon dioxide
CBPI	cytochalasin-block proliferation index
CA(s)	chromosome aberration(s)
COSEWIC	Committee on the status of endangered wildlife in Canada
CSEMDC	Comité sur le statut des espèces menacées de disparition au Canada
cyt-B	cytochalasine-B
DDT	dichloro-diphenyl-trichloroethane
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribose nucleic acid
ECS(s)	échange(s) de chromatide(s) soeur(s)
FCS	fetal calf serum
FPG	fluorescence-photolyse-Giemsa/fluorescent-photolysis-Giemsa
HAP(s)	hydrocarbure(s) aromatique(s) polycyclique(s)

Hg	chlorure de mercure/mercuric chloride
KCL	chlorure de potassium/potassium chloride
MeHg	chlorure de méthyle de mercure/methyl mercuric chloride
MI	mitotic index
µg/g	microgramme par gramme/microgram per gram
µg/ml	microgramme par millimètre/microgram per millimeter
MMC	mitomycine C
MN	micronuclei/micronoyau(x)
MNC(s)	micronucleated cell(s)
OC(s)	organochlorine(s)
PAH(s)	polycyclic aromatic hydrocarbon(s)
PAH-M	polycyclic aromatic hydrocarbon mixture
PRI	proliferation index
rpm	rotations per minute
SCE(s)	sister chromatid exchange(s)
SVF	sérum de veau foetal
UV	ultraviolet(s)
v/v	volume per volume

LISTE DES ANNEXES

1. Autres études effectuées lors de cet ouvrage

LISTE DES ARTICLES

I. Mercury induced micronuclei in skin fibroblasts of beluga whales.

Auteurs: J. M. Gauthier, H. Dubeau et É. Rassart.

Revue: Environmental Toxicology and Chemistry (sous presse).

II. Micronuclei induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in isolated beluga whale fibroblasts.

Auteurs: J. M. Gauthier, H. Dubeau et É. Rassart.

Monographie: Cell and Molecular Biology of Marine Mammals. C. Pfeiffer (éditeur). Krieger Publishing Co. (sous presse).

III. Induction of micronuclei by organochlorine compounds *in vitro* in beluga whale skin fibroblasts.

Auteurs: J. M. Gauthier, H. Dubeau et É. Rassart.

Revue: Mutation Research (sous presse).

IV. Biomarkers of DNA damage in marine mammals.

Auteurs: J. M. Gauthier, H. Dubeau, É. Rassart, W. M. Jarman et R. S. Wells.

Revue: Marine Mammal Science (soumis).

À Lucille et Guy Gauthier,

REMERCIEMENTS

Je voudrais particulièrement remercier ma directrice de thèse, Dr Hélène Dubeau, et mon directeur de thèse, Dr Éric Rassart, pour leur soutien envers mes recherches même si ces dernières étaient en dehors de leurs domaines usuels de recherche, ainsi que pour leur grande confiance en mon autonomie et mon jugement, leurs précieux conseils, et leur soutien financier et logistique. J'aimerais spécialement remercier Hélène pour ses encouragements multiples et gratifiants pendant tous mes travaux et même après son départ de l'UQAM. Je remercie Marcelo De Oliveira Bahia, un Brésilien souriant venu faire sa maîtrise au Québec et grâce à qui j'ai eu l'idée d'appliquer les tests cytogénétiques chez les mammifères marins. Je désire remercier tous les gens des laboratoires d'Hélène et d'Eric, et particulièrement Richard Bergeron, Florence Lacasse, Stéphane Vincent, Marcelo De Oliveira Bahia, Dr Corinne Barat, Monique Chardola et Diane Séguin, et le personnel du pavillon des Sciences de l'UQAM pour leur aide technique. J'aimerais remercier les gens du laboratoire d'Éric pour avoir enduré ma monopolisation fréquente de l'ordinateur. J'aimerais remercier les membres de mon comité de thèse, Dr Nicole Lemieux, Dr Daniel Martineau et Dr Francine Denizeau, qui m'ont fourni d'importants commentaires et conseils sur mon projet de thèse lors de mon examen prédoctoral. J'aimerais manifester ma gratitude envers Dr Sylvain Deguise pour les échantillons de peau de béluga de l'arctique, Dr Igar Mikealian et Dr Daniel Martineau pour les échantillons de peau et d'organes des bélugas du St-Laurent, Clint Wright, Dr Jeff Boehm, Ben Housten, Marc Dufresne, Dr Clément Lanthier et la Société de zoologie de Granby, et

Dr Randy Wells et l'équipe de Mote Marine Laboratory pour la récolte des échantillons de sang de mammifères marins. Je voudrais remercier les Drs Chris Metcalfe, Émilien Pelletier, Darrell Thompkins et Nicole Lemieux pour leurs conseils et leurs suggestions avant la soumission des manuscrits pour publication. J'aimerais finalement remercier les membres de mon jury de thèse les Drs Marcel Cadotte, Nicole Lemieux et Michel Fournier pour avoir fourni dans de très bref délai leurs précieux commentaires et corrections.

Cet ouvrage a été subventionné par les Fonds pour la formation de chercheuses et chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) du Québec, l'agence américaine US Environmental Protection Agency (USEPA), le Programme d'aide à la recherche de l'UQAM et l'Institut d'énergie et de géosciences de l'Université de l'Utah. Mon soutien financier personnel a été fourni par le FCAR, le USEPA ainsi que le Programme d'aide à la recherche de l'UQAM.

Enfin, je voudrais aussi remercier mes parents, à qui cette thèse est dédiée, mon Amour Patrick et mes amies et amis pour leurs encouragements et pour m'avoir fait sourire et rire tout au long de mes travaux de doctorat.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 HISTOIRE NATURELLE

1.1.1 Le béluga

Les bélugas (*Delphinapterus leucas*) adultes sont entièrement blancs, mesurent entre 3 et 5 m de long et pèsent entre 300 et 1300 kg (Brodie, 1985). Leur longévité est d'environ 30 ans (Brodie, 1971; Sergeant, 1973). Les mâles sont généralement plus gros que les femelles (Brodie, 1985). Les juvéniles sont bruns-gris et acquièrent la couleur de l'adulte et la maturité sexuelle à 5 ans pour les femelles et vers 8 à 9 ans pour les mâles (Brodie, 1971; Sergeant, 1973; Burns et Seaman, 1985). L'accouplement se fait au printemps et les naissances en été. Les femelles mettent bas un veau aux 2-3 ans (Sergeant, 1973). La gestation est de 14.5 mois et l'allaitement peut durer de 1 an à plus de 2 ans (Burns et Seaman, 1985). Le taux de reproduction annuel est environ de 9.4% (Burns et Seaman, 1985; Sergeant, 1986).

Les bélugas ont une distribution mondiale arctique et subarctique et le nombre total de bélugas dans les eaux canadiennes est d'environ 60 000 (IWC, 1992). Sept populations de bélugas ont été identifiées au Canada d'après leurs zones d'estivage. Il s'agit des populations du nord et de l'ouest de la baie d'Hudson, de la mer de Beaufort, de la haute arctique et du Groenland, de l'est de la baie d'Hudson et de la baie James, de la baie d'Ungava, du sud-ouest de l'île de Baffin, et de l'estuaire du St-Laurent (IWC, 1992). La plupart des populations migrent de façon saisonnière en fonction des mouvements des

glaces et se retrouvent ainsi dans les eaux profondes à la périphérie des glaces l'hiver et dans les estuaires l'été (Reeves et Mitchell, 1987). Les bélugas démontrent une fidélité aux sites d'estivage, qui sont importants pour l'alimentation, la mise bas et la mue (Sergeant, 1973, Caron et Smith, 1990; St-Aubin et al., 1990). La population de l'ouest et du nord de la baie d'Hudson est composée d'environ 25 000 individus et est considérée en santé (IWC, 1992; D. J. St-Aubin, communic. pers.).

Les bélugas du St-Laurent forment une petite population en danger (Comité sur le statut des espèces menacées de disparition au Canada- CSEMDC) géographiquement isolée et non-migratoire d'environ 450 à 700 animaux (Kingsley, 1993, 1996; Michaud, 1993). L'alimentation est composée surtout de capelan (*Mallotus villosus*), mais aussi d'une variété de poissons et d'invertébrés, tels que le lançon d'Amérique (*Ammonodytes americanus*), la morue (*Gadus* sp), le flétan du Groenland (*Reinhardtius hypoglossoides*), l'éperlan (*Osmerus mordax*), le hareng (*Clupea harengus*), le ver de mer *Nereis* sp, les céphalopodes, les décapodes et les amphipodes (Vladykov, 1946; Sergeant, 1973). Les bélugas du St-Laurent se nourrissent probablement aussi d'anguilles (*Anguilla rostrata*) lorsqu'elles migrent dans le St-Laurent pendant l'automne (Béland et al., 1988; Hickie et al., 1991). Les bélugas peuvent plonger confortablement à 350m afin de se nourrir d'invertébrés de fond (Dalcourt et al., 1992; Martin et Smith, 1992)

Il a été estimé que cette population comptait au moins 5000 individus avant 1885, mais ce nombre a été fortement réduit par la chasse qui a eu lieu jusqu'au milieu des années 1900s (Reeves et Mitchell, 1984). Cette population a été officiellement protégée en 1979 par l'amendement de l'Acte des pêches sur les régulations de la protection des

bélugas. En dépit de ce statut d'espèce protégée, les recensements effectués de 1973 à 1995 ont indiqué que la population demeure stable ou n'augmente que lentement (e.g., Pippard, 1985; Sergent et Hoek, 1988; Kingsley, 1993, 1996). L'absence du rétablissement de la population a été attribuée à plusieurs facteurs, tels que la pollution environnementale, la dégradation de l'habitat, le harcèlement par les bateaux, une diversité génétique réduite et la consommation par la chasse du potentiel naturel de croissance (Bailey et Zinger, 1995; Kingsley, 1998).

1.1.2 Le dauphin à gros nez

Les dauphins à gros nez (*Tursiops truncatus*) sont distribués en grand nombre dans les eaux tropicales et tempérées chaudes du monde entier (Mead et Potter, 1990; Baird et al., 1993). L'espèce n'est pas menacée, bien que la population de la mer Noire en Europe soit présentement considérée en danger (Baird et al., 1993). On distingue deux formes de dauphins à gros nez à travers le monde, la forme côtière et la forme hauturière, lesquelles se différencient par de nombreuses caractéristiques (Baird et al., 1993).

Plusieurs paramètres d'histoire naturelle varient selon la région géographique (Wells et Scott, sous presse). Ces paramètres sont présentés ici pour les populations de l'est des États-Unis, plus particulièrement pour la population de la baie de Sarasota, Floride, utilisée dans cet ouvrage. Les dauphins à gros nez sont de couleur gris-brun foncé sur le dos, gris pâle sur les flancs et blanc rosâtre sur le ventre (Wells et Scott, sous presse). Les adultes mesurent environ 2.5 m et pèsent en moyenne 250 kg (Mead et Potter, 1990; Read et al., 1993). L'espérance de vie est de 30 à 40 ans pour les mâles et de

40 à 50 ans pour les femelles (Scott et al., 1990; Wells et Scott, sous presse). Les femelles atteignent la maturité sexuelle vers 6 à 7 ans et les mâles vers l'âge de 10 ans (Wells et al., 1987; Mead et Potter, 1990). Les naissances se produisent surtout au printemps, et à un moindre degré, à l'automne (Mead et Potter, 1990; Scott et al., 1990). La gestation dure environ 1 an et l'allaitement 18 à 20 mois (Perrin et Reilly, 1984). Les veaux sont sevrés entre l'âge de 3 et 6 ans (Scott et al., 1990). L'alimentation est composée principalement de grondeur de l'Atlantique (*Micropogonias undulatus*), de perche argentée (*Bairdiella chrysoura*), de truite de sable marine (*Cynoscion arenarius*), de mullet (*Mugil sp*), de calmar bref (*Lolliguncula brevis*) et de poisson moucheté (*Leiostomus xanthurus*) (Barros et Odell, 1990).

Les dauphins à gros nez qui résident dans les eaux côtières de la baie de Sarasota constituent une communauté d'environ 100 individus qui sont étudiés depuis près de 30 ans (Wells et al., 1987). Ils sont considérés des résidents permanents de ces eaux peu profondes (moins de 4m) et se mélangent peu avec les dauphins des populations avoisinantes (Wells, 1986; Wells et al., 1987). Les analyses des paramètres biochimiques et immunologiques du sang, les examens médicaux faits par des vétérinaires et les observations effectuées à long terme sur les individus de cette population semblent démontrer qu'il s'agit d'une communauté stable et en santé (Scott et al., 1990; Lahvis et al., 1993).

1.1.3 Le phoque gris

Les phoques gris (*Halichoerus grypus*) sont distribués dans les eaux tempérées froides et arctiques du nord-ouest et nord-est de l'Atlantique, incluant les eaux du golfe St-Laurent, des provinces maritimes du Canada, de l'Angleterre, de la Norvège, de l'Islande et de la mer de Baltique (King, 1983). Le manteau des phoques gris est blanc à la naissance, et varie, chez les adultes, entre le gris foncé, le gris pâle, le brun et l'argent et peut aussi porter des tâches distribuées de façon variable sur le corps (King, 1983). Une mue annuelle est nécessaire pour renouveler la peau et les poils (King, 1983). La tête des phoques gris a une forme caractéristique d'allure chevaline et un nez allongé de type romain (Katona et al., 1983; King, 1983). Les femelles adultes mesurent environ 2 m de longueur et pèsent environ 170 kg, tandis que les mâles atteignent 2.3 m et 230 kg (Katona et al., 1983; King, 1983). L'espérance de vie des mâles et des femelles est respectivement de 35 et 45 ans (Katona et al., 1983). L'âge de la maturité sexuelle est environ de 5.5 ans chez les deux sexes (Hamill et Gosselin, 1995). Après l'accouplement, l'ovule fertilisé se développe en blastocyste en 9 jours et son développement est ensuite suspendu pour 3.5 mois, période après laquelle il est réactivé, pour une gestation active de 8 mois (King, 1983). Ce développement retardé permet de synchroniser les naissances avec l'accouplement (Bateman, 1985). Les veaux sont allaités environ 15 jours puis sevrés de façon abrupte. Ils perdent alors par mue leur lanugo blanc et commencent à se nourrir par eux-même trois semaines après le sevrage (Baker et al., 1995).

La distribution géographique des phoques gris de l'Atlantique nord-ouest s'étend du golfe du Maine jusqu'au nord du Labrador (King, 1983; Stobo et al., 1990). Les phoques gris ne migrent pas, mais certains animaux se dispersent de façon saisonnière sur

de grandes étendues dans les eaux canadiennes (Stobo et al., 1990). On estime à environ 155 000 le nombre de phoques gris de l'Atlantique nord-ouest avec une production annuelle de 16 000 bébés (Mohn et Bowen, 1996; Hamill et al., 1998). La reproduction a lieu sur glace ou sur terre entre décembre et février à l'île de Sable et dans le sud du golfe St-Laurent (Hamill et al., 1998). L'alimentation est variable selon les saisons et les régions et est surtout constituée de lançon nordique (*Ammodytes dubius*), de morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), de hareng, de goberge (*Pollachius virens*), de merlu argenté (*Merluccius bilinearis*), de maquereau (*Scomber scombus*) et de calmar (*Illex illecebrosus*) dans les eaux canadiennes (Bowen et al., 1993). La population des phoques gris du nord-ouest de l'Atlantique est considérée en santé, continue à augmenter en nombre depuis les années 1960s et a récemment atteint son plus haut niveau depuis les premières estimations faites il y a plus de 30 ans (Mansfield, 1977; Hamill et al., 1992).

1.1.4 Le phoque du Groenland

Les phoques du Groenland (*Phoca groenlandicus*) sont largement distribués dans les eaux tempérées froides ou arctiques du nord-est de l'Europe, de l'arctique Canadien, du Québec et des provinces maritimes canadiennes (King, 1983). Le manteau est blanc à la naissance et devient gris pâle avec une tache noire en forme de fer à cheval qui couvre le dos et les flancs chez les adultes (King, 1983). Le manteau est remplacé par mue annuellement (King, 1983). Les adultes mesurent 1.7m de longueur et pèsent 135kg et il n'y a pas de dimorphisme marqué entre les sexes (King, 1983; Hamill et al., 1995). L'espérance de vie est d'environ 30 ans (Katona et al., 1983). L'accouplement se fait à la

surface de l'eau après le sevrage des bébés (King, 1983). Le délai de l'implantation du blastocyste est de 4.5 mois et la gestation active de 7 mois (King, 1983). Les veaux sont allaités environ 15 jours, puis sevrés de façon abrupte. Ils perdent alors par mue leur lanugo blanc, et commencent à se nourrir par eux-même trois semaines après le sevrage (Stewart et Lavigne, 1980; King, 1983).

Le phoque du Groenland est l'espèce de phoque la plus répandue dans le nord-ouest de l'Atlantique et compte environ 4.8 millions d'individus avec une production annuelle estimée entre 5 et 10% (Shelton et al., 1996; Stenson et al., 1996). Le régime alimentaire varie de façon saisonnière et régionale et est composé, dans les eaux canadiennes, surtout de capelan, de morue de l'arctique (*Gadus ogac*), de morue de l'Atlantique, de lançon, de hareng, et d'une variété d'amphipodes et de décapodes, telles que les crevettes *Pandalus sp* (Beck et al., 1993; Stenson et al., 1997). Les jeunes se nourrissent davantage d'organismes invertébrés, mais doivent aussi se nourrir de poisson afin de maintenir leur masse corporelle (Martenssen et al., 1994). Les phoques migrent du Groenland et des eaux de l'est de l'arctique canadien jusqu'à Terre Neuve et au golfe du St-Laurent à l'automne pour mettre bas, s'accoupler, se nourrir et muer (Stenson et al., 1997). Ils retournent ensuite vers le nord au printemps pour se nourrir dans les eaux de l'ouest du Groenland et de l'est de l'arctique canadien (Stenson et al., 1997). Les sites de reproduction se retrouvent sur la glace à la dérive près des îles de la Madeleine et au nord-est de Terre Neuve (Stenson et al., 1996). Ils résident entre 180 et 270 jours par année dans le golfe St-Laurent et autour de Terre Neuve (Shelton et al., 1995). Selon des études récentes, la population des phoques du Groenland du nord-ouest de l'Atlantique est

considérée en santé, augmente en nombre depuis les années 1970s et a récemment atteint son plus haut niveau depuis les premières estimations faites il y a 46 ans (Shelton et al., 1996).

1.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX

Les organochlorés (OCs), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et les métaux lourds sont des composés toxiques, omniprésents et persistants dans l'environnement (IARC, 1993; Léonard et al., 1983; ATSDR, 1990). Ils sont transportés et dispersés à l'échelle mondiale surtout par voie atmosphérique et sont retrouvés dans une variété d'échantillons biotiques et abiotiques à travers le monde (IARC 1983; Léonard et al., 1983; Biddleman et al., 1989; Iwata et al., 1993; Fellin et al., 1996; Oehme et al., 1996).

1.2.1 Le mercure

Le mercure est un métal lourd déversé dans l'environnement par des sources naturelles et anthropiques (Léonard et al., 1983). Les sources naturelles incluent l'érosion et la désagrégation et le dégazage à partir de la croûte terrestre et des océans (Léonard et al., 1983). Les principales industries responsables de la dispersion du mercure dans l'environnement sont celles impliquées dans la consommation de carburants fossiles, la production du chlore et de la soude, l'activité minière, l'agriculture, l'amalgamation, la fabrication du papier, de l'encre, de fongicides et d'équipements électriques (Mitra, 1986).

Le mercure est déchargé dans l'environnement sous plusieurs formes, telles que le mercure métallique, les composés de mercure inorganiques et les composés de mercure de type alkyls, alkoxy ou aryls (Léonard et al., 1983).

Le mercure inorganique ou chlorure de mercure (Hg) et le chlorure de méthyle de mercure (MeHg) ont respectivement les structures chimiques HgCl_2 et CH_3HgCl . Le Hg peut être converti en MeHg ou en chlorure de diméthylmercure par l'action des bactéries méthanogènes dans les sédiments ou dans l'organisme (Jensen et Jernelöv, 1969; Léonard et al., 1983). Le MeHg montre un potentiel élevé de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire aquatique et représente la forme prédominante du mercure (50-95%) dans la plupart des espèces de poissons (Pelletier, 1985; Lasorsa et Allen-Gil, 1997). Le mercure se concentre de façon préférentielle dans le foie des mammifères (Thompson, 1990). Certains animaux, tels que les mammifères marins, peuvent déméthyliser le MeHg accumulé dans le foie, et à un moindre degré dans d'autres organes, en mercure inorganique sous forme d'inclusions de tiemannite (selenide mercuriel), composé non-métabolisable et moins toxique pour l'organisme (Martoja et Berry, 1980; Palmisano et al., 1995).

Parmi les composés du mercure, le MeHg est le plus répandu dans l'environnement et le plus toxique (IARC, 1993). Le MeHg est neurotoxique, tératogène, embryotoxique, génotoxique et est considéré cancérigène chez les animaux expérimentaux et possiblement cancérigène chez les humains (Bakir et al., 1973; Koos et Longo, 1976; IARC, 1987; IARC, 1993). Des expériences réalisées chez des souris et des rats ont démontré que le MeHg et le Hg induisent des tumeurs rénales chez ces animaux

(Boffeta et al., 1993; IARC, 1993). L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent ne permet pas d'exclure la possibilité d'un risque accru de cancers du poumon, du rein et du système nerveux central chez les humains exposés au mercure (Boffeta et al., 1993; IARC, 1993).

1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAPs sont produits par combustion incomplète de matière organique et sont retrouvés dans la matière combustible fossilisée (Figure 1.1) (IARC, 1983). Les HAPs distribués dans l'environnement sont chimiquement non-réactifs (IARC, 1983). Ils deviennent réactifs lorsqu'ils sont métabolisés dans l'organisme en métabolites électrophiles qui se lient à l'ADN et sont responsables de l'induction tumorale et des effets toxiques de ces composés (Pelkonen et Nebert, 1982; Harvey, 1991; Nesnow et al., 1995). Les HAPs sont des substances très lipophiles (IARC, 1983). Cependant, le métabolisme des HAPs est très rapide chez les mammifères, ce qui résulte en une bioaccumulation faible de ces composés chez ces animaux (Fries, 1995). Les HAPs sont surtout métabolisés par le foie, mais tous les tissus et organes du corps ont la capacité, quoique à un moindre degré, de métaboliser ces composés (IARC, 1983). Les HAPs sont oxydés par l'enzyme aryl hydrocarbure hydroxylase (AHH) pour produire des époxydes qui peuvent être convertis en conjugués glutathione (GSH) par l'enzyme GSH transférase et être éliminés par les fèces, convertis en phénols ou en quinones, ou subir une hydratation et former des dihydrodiols par l'action de l'enzyme époxyde hydrolase (Pelkonen et Nebert, 1982; ATSDR, 1990). Les phénols et les quinones peuvent à leur tour être excrétés sous

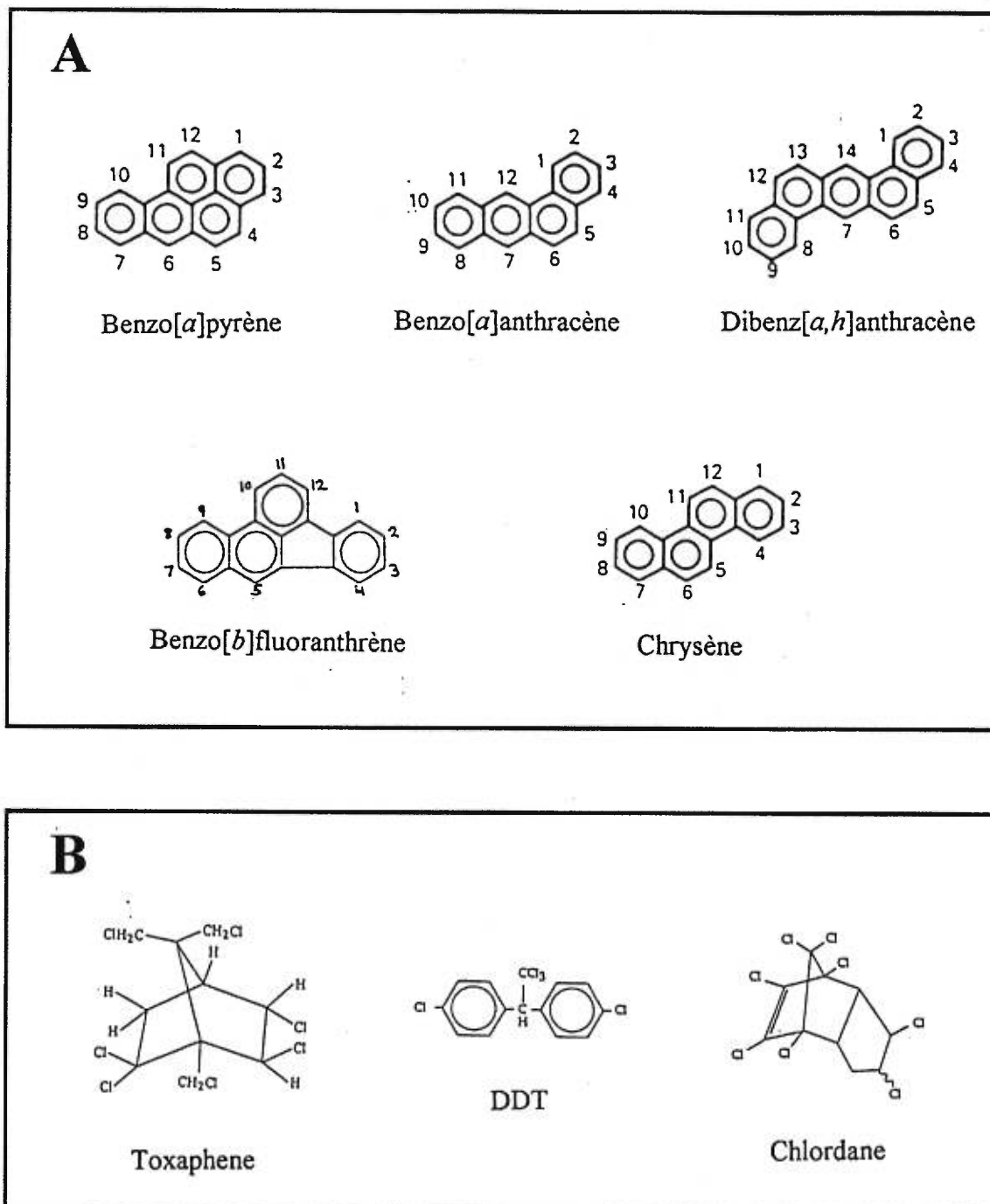


Figure 1.1: Structure chimique des HAPs (A) et des OCs (B) utilisés dans cet ouvrage.

la forme de conjugués glucuroniques et d'esters de sulfate par l'enzyme UDP-glucoronyl transférase. Les dihydrodiols peuvent soit être convertis en glucuronides, être métabolisés en phénols-diols ou transformés en diol-époxyde (7,8-diol-9,10-époxyde et 9,10-diol-7,8-époxyde) (Pelkonen et Nebert, 1982). Les phénols-diols pourront être convertis en glucuronides puis éliminés, tandis que les diol-époxydes seront convertis en tétraols ou en conjugués GSH (Pelkonen et Nebert, 1982). Le métabolite 7,8-diol-9,10-époxyde est reconnu comme le plus cancérigène de tous les métabolites des HAPs (Pelkonen et Nebert, 1982; ATSDR, 1990). Ce métabolite se lie à l'ADN de façon covalente pour former un adduit, majoritairement avec l'azote en position 2 de la guanine, bien qu'il puisse aussi se lier à l'adénine et la cytosine (DePierre et Ernster, 1978; Pelkonen et Nebert, 1982). Ce lien conduit à des problèmes de fonctionnement de l'ARN polymérase lors de la transcription et entraîne une reconnaissance ralentie par les systèmes de réparation, causant ainsi ultimement la transformation cellulaire (DePierre et Ernster, 1978; Pelkonen et Nebert, 1982).

Le potentiel cancérigène des HAPs varie selon leurs caractéristiques structurales, mais la majorité des HAPs multicycliques (>3 cycles) sont considérés cancérigènes chez les animaux expérimentaux et probablement cancérigènes chez les humains (IARC, 1983; Harvey, 1991). De plus, les mélanges d'HAPs provenant de la production d'aluminium, de la gazeification du charbon, de la fumée de cigarette, de la production de coke, des fonderies de fer et d'acier, et de la suie sont considérés cancérigènes chez les humains (IARC, 1984, 1987). Les HAPs peuvent causer le cancer des poumons, des ovaires, de l'estomac, des reins, de la vessie et du colon, ainsi que des leucémies (IARC, 1984;

ATSDR, 1990). Les HAPs traversent aisément la barrière placentaire et peuvent ainsi causer des effets néfastes pour le fœtus (IARC, 1983). En plus d'être cancérigènes, plusieurs HAPs sont tératogènes, embryotoxiques et immunosuppresseurs chez les mammifères (IARC, 1983; Burchiel, 1996).

1.2.3 Les organochlorés (OCs)

Les OCs, tel que le groupe du dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT), des chlordanes et du toxaphène (camphènes polychlorés) utilisés dans cette étude (Figure 1.1), sont des insecticides de nature lipophile qui ont une grande stabilité chimique et sont très solubles dans les tissus graisseux de l'organisme (Spindler, 1983; Hardgrave et al., 1989). En raison de ces propriétés, ces composés et leurs métabolites sont omniprésents et persistants dans l'environnement et ont un potentiel élevé de bioaccumulation dans les tissus graisseux de l'organisme (Mackay, 1982; Oehme et Otter, 1984; Hardgrave et al., 1989). Les OCs peuvent contaminer le bébé via le placenta, mais surtout par leur présence dans les lipides du lait maternel chez les humains et autres mammifères (USEPA, 1985a,b).

Ces insecticides sont métabolisés par le système des oxydases à fonctions mixtes impliquant le groupe de cytochrome P-450 en des métabolites plus hydrophiles qui peuvent être éliminés par la bile ou les fèces (Matsumura, 1985). Les OCs sont neurotoxiques, immunotoxiques, causent des effets néfastes sur le système endocrinien et la reproduction, et sont possiblement cancérigènes (Peakall, 1970; LeBoeuf et Bonnell,

1971; Allen et al., 1983; USEPA, 1985a,b; IARC, 1987; Saleh, 1991; Colborn et al., 1993; Banerjee et al., 1996).

L'usage du DDT est fortement limité depuis la fin des années 1960s dans la majorité des pays occidentaux et a été banni en Amérique du nord en 1972 (Rappaport et al., 1985; Metcalfe, 1990). Par contre, il est encore utilisé dans certains pays en voie de développement pour des raisons de santé publique où s'évit la malaria (Metcalfe, 1990; Iwata et al., 1993). Le DDT est synthétisé par condensation du chloral et du chlorobenzène en présence d'un agent de condensation, tel que l'acide sulfurique (Melnikov et al., 1971). Ce produit est un mélange complexe d'isomères différents dans lequel seul l'isomère p,p'-DDT, qui constitue 75% du mélange, possède des pouvoirs insecticides (Melnikov et al., 1971). Les DDE et DDD sont les métabolites principaux de déhydrochlorination et de déchlorination du DDT dans les tissus vivants et dans l'environnement, et sont plus résistants à la dégradation que le DDT (Crosby, 1969; Hadina et al., 1975; Walker, 1975). Le DDT peut causer le dysfonctionnement reproductif chez les mammifères ainsi que l'amincissement des coquilles d'oeuf et l'échec reproductif chez certaines espèces d'oiseaux (Peakall, 1970; LeBoeuf et Bonnell, 1971; Lundberg, 1973). Le DDT est considéré carcinogène chez les animaux expérimentaux et possiblement cancérigène chez l'humain (IARC, 1987).

Le toxaphène est un mélange complexe de plusieurs congénères chlorés de camphènes et de bornanes, utilisé comme insecticide sur les plantes agricoles, particulièrement le coton, et sur les animaux de ferme (Meister, 1987; Saleh, 1991). Il est synthétisé à partir de camphènes par une réaction de radicaux libres activé par le chlore et

la lumière ultraviolette (Saleh, 1991). Son utilisation a été limitée au début des années 1980s au Canada et aux États-Unis, mais il est encore utilisé dans certains pays, tels que ceux de l'Asie (Saleh, 1987; Saleh, 1991; Voldner et Li, 1993). Le toxaphène est métabolisé par déchlorination et déhydrochlorination en plusieurs métabolites différents correspondants à leurs congénères respectifs (Chandurkar et Matsumura, 1979; Saleh, 1991). Le toxaphène est considéré carcinogène chez les animaux expérimentaux et possiblement cancérigène chez l'humain (IARC, 1987). Il a été démontré que le toxaphène pouvait causer des cancers du foie, de l'utérus, des organes endocriniens et de la thyroïde, ainsi que des lymphosarcomes et des leucémies chez des rats et/ou des souris (Reuber, 1979; Saleh, 1991), et être promoteur de cancer après initiation avec le benzo[*a*]pyrène (BP) (Triolo et al., 1982).

Le chlordane est manufacturé depuis la fin des années 1940s et a été utilisé comme pesticide à large spectre, mais particulièrement pour le contrôle des termites (Vettorazi, 1975; Ware, 1988; Iwata et al., 1993). L'usage du chlordane a été suspendu ou sévèrement restreint dans la plupart des pays développés (Iwata et al., 1993). Le chlordane est synthétisé par la fusion Diels-Alder de l'hexachlorocyclopentadiène et du cyclopentadiène pour former un intermédiaire, le chlordène, qui est ensuite chloré pour produire une forme technique du chlordane composée de plusieurs isomères différents ou une forme de chlordane purifiée (Miyazaki et al., 1985; Nomeir et Hajjar, 1988). Certaines composantes du mélange du chlordane sont métabolisées en oxychlordane chez les mammifères, forme plus toxique que le chlordane (NRCC, 1974; Matsumura, 1985). Le chlordane est possiblement cancérigène chez les animaux expérimentaux, mais les

preuves sont insuffisantes pour le qualifier de cancérigène chez l'humain (IARC, 1987). Le chlordane cause surtout des tumeurs hépatiques (USEPA, 1985a).

1.3. CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX CHEZ LES BÉLUGAS ET AUTRES MAMMIFÈRES MARINS

La majorité des mammifères marins ont une longue espérance de vie, se nourrissent de proies en position élevée dans la chaîne alimentaire et allaitent leurs jeunes avec du lait riche en gras. Ils sont donc très susceptibles à l'exposition chronique et à l'accumulation de concentrations élevées de polluants environnementaux pendant leur vie.

L'habitat des bélugas du St-Laurent est pollué par plusieurs contaminants environnementaux, tels que les HAPs, les OCs et le mercure, qui proviennent principalement du dépôt atmosphérique et des industries locales (Martel et al., 1986; Dalcourt et al., 1992; Gobeil et Cossa, 1993; Gearing et al., 1994). Les alumineries constituent la source locale principale des HAPs (Martel et al., 1986; Cossa, 1990; Gearing et al., 1994). Les sources de mercure sont majoritairement anthropiques, surtout attribuées aux déversements d'usines de chlor-alkali et d'alumineries (Gobeil et Cossa, 1993). Le DDT a été utilisé pour contrôler les insectes dans les forêts du Québec et du Nouveau Brunswick entre 1950 et 1960 et pour le contrôle des rongeurs et des chauves-souris jusqu'en 1990 (Couillard, 1982; Kalil et al., 1984; Agriculture Canada, 1990; Cossa, 1990). Les autres sources de ces composés incluent l'influx des Grands Lacs et des tributaires du St-Laurent, les effluents municipaux et l'érosion des sols (Lum et al., 1987; Sylvestre et al., 1987; Cossa, 1990; Pham et al., 1993; Quémarais et al., 1994).

Les bélugas du St-Laurent montrent des concentrations élevées d'OCs et de mercure et des adduits de BP sur l'ADN ont été retrouvés dans leurs tissus (Tableau 1.1) (Martineau et al., 1987; Muir et al., 1990, 1996; Wagemann et al., 1990; Martineau et al., 1994). De plus, des autopsies réalisées sur des carcasses échouées ont démontré une prévalence élevée de tumeurs, de maladies et d'infections opportunistes (Martineau et al., 1988; DeGuise et al., 1994, 1995). La modélisation de population, des études de terrain et des observations des organes reproducteurs femelles suggèrent des difficultés possibles au niveau reproductif chez cette population (Béland et al., 1988, 1993; Michaud, 1993). Le cancer a été diagnostiqué comme la principale cause de décès chez 18% des 97 carcasses examinées et l'incidence brute de cancer a été estimée à 233/100 000, valeur plus élevée que chez la plupart des populations humaines et des animaux domestiques (Martineau et al., sous presse; Martineau, pers. comm.). La majorité des cancers retrouvés chez les bélugas du St-Laurent sont des adénocarcinomes du petit intestin, mais des adénocarcinomes et d'autres types de cancers ont aussi été observés dans les ovaires, la vessie, le foie, l'estomac, les glandes salivaires et les glandes mammaires (DeGuise et al., 1994; Martineau et al., 1995). Au contraire, les bélugas de l'arctique montrent des concentrations faibles de contaminants et ne présentent pas d'adduits de BP sur l'ADN dans leurs tissus (Tableau 1.1) (Muir et al., 1990; Martineau et al., 1994). De plus, aucune indication de cancer n'a été retrouvée chez approximativement 100 carcasses de bélugas de l'Arctique échantillonnées pour des examens biologiques de routine (D. J. St. Aubin, communic. pers.). Dû au fait que les polluants environnementaux présents chez les bélugas du St-Laurent ont été associés au cancer, à l'immunosuppression et au

Tableau 1.1: Concentrations (en partie par millions) moyennes, minimales et maximales (entre parenthèses) des contaminants environnementaux chez les bélugas du St-Laurent et de l'ouest de la baie d'Hudson.

Contaminant	St-Laurent	Ouest de la baie d'Hudson
Σ BPC ^a	54 (8-576)	2 (0.3-3)
Σ DDT ^a	49 (3-389)	2 (0.2-3)
Toxaphene ^a	13 (2-46)	3 (0.7-6)
Σ CHL ^a	6 (1-28)	2 (0.4-3)
Mirex ^a	2 (0.1-7)	0.02 (0-0.03)
Mercure total ^b	34 (0.4-202)	7 (0.02-25)
Adduits de BP ^c	120	0

BPC= biphényles polychlorés, CHL= composés du chlordane.

^a: sur une base de poids lipidique.

^b: sur une base de poids frais.

^c: sur une base de $\mu\text{g/g}$ d'ADN.

D'après Martineau et al. (1987), Wagemann et al. (1990), Martineau et al. (1994) et Muir et al. (1996).

dysfonctionnement reproductif chez les animaux expérimentaux et les espèces sauvages, une relation causale entre ces contaminants et les maladies présentes chez les bélugas du St-Laurent a été suggérée (Peakall, 1970; LeBoeuf et Bonnell, 1971; Allen et al., 1983; USEPA, 1985a,b; IARC, 1987; Martineau et al., 1987; Saleh, 1991; Béland et al., 1993; Colborn et al., 1993; Lawrence, 1993; DeGuise et al., 1994; Banerjee et al., 1996; Burchiel, 1996). Des événements induits par les contaminants environnementaux, tels que l'induction tumorale, la promotion tumorale et l'immunosuppression, ont été proposés pour expliquer l'incidence élevée de cancer chez les bélugas du St-Laurent (DeGuise et al., 1994, 1995; Martineau et al., sous presse).

Contrairement aux bélugas du St-Laurent, les phoques gris, et particulièrement les phoques du Groenland, se nourrissent de façon saisonnière, d'une part dans l'estuaire et/ou le golfe du St-Laurent, et d'autre part dans les eaux moins polluées de l'océan Atlantique et de l'arctique (Beck et al., 1993; Bowen et al., 1993). Ces deux populations de phoques, ainsi que celle des dauphins à gros nez de la baie de Sarasota, sont considérées comme des populations en santé et ont en général des concentrations relativement faibles de contaminants environnementaux dans leurs tissus (Béland et al., 1992; Vedder et al., 1993; Beck et al., 1994). Par contre, d'autres populations de mammifères marins, tels que les dauphins de Thétis de la Méditerranée (*Stenella coeruleoalba*), les dauphins à gros nez de la côte est des États-Unis et de la Méditerranée, et les phoques gris de la mer de Baltique, ont montré des concentrations élevées de polluants environnementaux dans leurs tissus qui ont été associées à certaines maladies chez ces populations (Baker et al., 1984; Kuehl et al. 1991; Leonzio et al., 1992; Aguilar et Borrell 1994, Martineau et al.

1994, Olsson et al. 1994; Jenssen, 1996; Munson et al., 1998). Les concentrations de contaminants environnementaux chez ces populations de dauphins et de phoques sont respectivement d'environ 100 à 1000 fois et 20 à 70 fois plus élevées, respectivement, que chez les dauphins à gros nez de la baie de Sarasota et les phoques du nord-ouest de l'Atlantique (Kuehl et al., 1991; Béland et al., 1992; Addison et Stobo, 1993; Beck et al., 1993; Vedder et al., 1993; Aguilar et Borrell, 1994; Jenssen, 1996). Plusieurs des mortalités massives, des diminutions du nombre et des difficultés de rétablissement observées chez les populations de mammifères marins ont été attribuées à l'immunosuppression et à la disruption reproductive induites par la pollution environnementale (Béland et al., 1993; DeGuise et al., 1994; Olsson et al., 1994; Reijnders, 1994; Jenssen, 1996). La contamination chimique a aussi été impliquée dans la haute prévalence de cancer chez les otaries de la Californie (*Zalophus californianus*) (Gulland et al., 1996).

1.4 DÉTECTION DES LÉSIONS CHROMOSOMIQUES

Les lésions de l'ADN jouent un rôle important dans le développement du cancer et peuvent constituer un facteur de risque pour la tératogénèse et les maladies génétiques (Oshimura et Barrett, 1986; Evans, 1990; Tucker et Preston, 1996). Les lésions de l'ADN causées par des agents environnementaux peuvent se manifester au niveau du chromosome, du gène ou de la molécule. Les tests de micronoyaux (MN), d'échanges de chromatides-soeurs (ECSs) et d'aberrations chromosomiques (ACs) sont des techniques cytogénétiques bien connues qui ont été utilisées couramment pour évaluer les lésions

chromosomiques dans les cellules humaines et animales (Carrano et Moore, 1982; Natarajan et Obe, 1982; Carrano et Natarajan, 1988; Fenech, 1993; Tucker et Preston, 1996).

Une grande variété d'agents chimiques, physiques et biologiques sont capables d'induire des lésions dans l'ADN qui, lorsqu'elles ne sont pas réparées ou sont réparées de façon inadéquate, peuvent résulter en des MN, des ECSs et/ou des ACs observables par microscopie optique (Carrano et Natarajan, 1988; Savage, 1990). Les agents qui causent des lésions structurales sont dénommés des clastogènes tandis que ceux qui induisent des aberrations numériques sont appelés des turbagènes (Ishidate et al., 1988; Léonard, 1990). La majorité des agents chimiques qui interagissent avec l'ADN (agents génotoxiques) peuvent être détectés par ces trois tests cytogénétiques (Natarajan et Obe, 1982; Heddle et al., 1991). De plus, ces tests peuvent mettre en évidence l'activité d'agents carcinogènes qui ne sont pas détectés ou sont difficilement détectés par les tests de mutagenicité bactériens, tel que le test de AMES (Natarajan et Obe, 1982; DeFlora et al., 1991).

Puisque les lésions chromosomiques induites par les agents environnementaux, particulièrement celles induites par les agents clastogènes, sont le résultat d'une interaction avec l'ADN, on peut les utiliser comme des biomarqueurs des dommages dans cette molécule de même que de l'activité mutagénique de ces agents (Carrano et Natarajan, 1988; Evans, 1990). Cet usage de la détection des effets cytogénétiques comme test d'évaluation du potentiel mutagène d'agents environnementaux est basé sur la supposition que les agents capables d'augmenter la fréquence de lésions chromosomiques produisent aussi une augmentation considérable du nombre de mutations géniques (Natarajan et Obe,

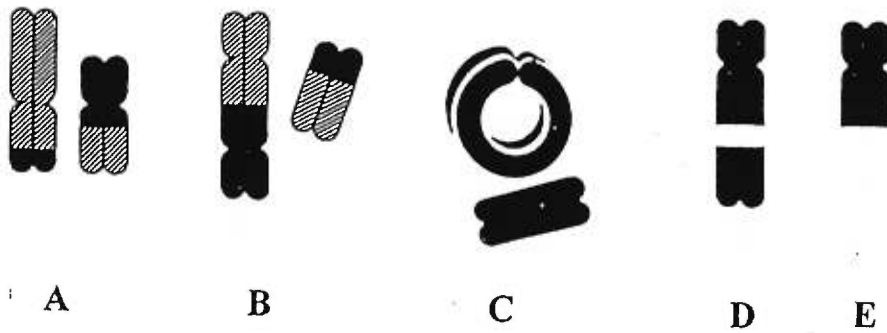
1982; Evans, 1990). Malgré la plus grande rapidité et facilité de la technique d'évaluation des MN, il est suggéré que les trois tests soient utilisés de façon complémentaire car ils mettent en évidence des types différents de dommage à l'ADN qui peuvent avoir des sensibilités différentes aux agents génotoxiques (Carrano et Natarajan, 1988, Fenech, 1993; Tucker et Preston, 1996).

1.4.1 Les aberrations chromosomiques (ACs)

Les ACs sont soit de type structural (e.g., brèches, cassures et remaniements ou pertes de segments chromosomiques) ou numérique (aneuploïdies et polyploïdies) et sont observées en métaphase du cycle cellulaire (Carrano et Natarajan, 1988; Evans, 1990; Savage, 1990). La détection des d'ACs de structures est la technique la plus connue pour l'analyse des lésions chromosomiques (Carrano et Natarajan, 1988).

Les ACs de structures résultent de lésions de l'ADN qui mènent à des discontinuités dans la double hélice et à des réarrangements de formes anormales (Carrano et Natarajan, 1988; Moore et Bender, 1993). Ces ACs peuvent être de type chromosomique ou chromatidien (Moore et Bender, 1993). Des exemples de ces deux types d'ACs sont illustrées à la figure 1.2. Les aberrations de type chromosomique sont celles où l'unité de cassure et de réunion est le chromosome entier, c'est à dire implique les deux chromatides-soeurs, alors que les aberrations de type chromatidien implique une seule des deux chromatides-soeurs (Evans, 1984; Moore et Bender, 1993). Une relation étroite existe entre la nature du mutagène, le type d'aberration produit et le stade cellulaire au cours duquel les cellules sont exposées. Les substances chimiques peuvent avoir une

AC de type chromosomique



AC de type chromatidien

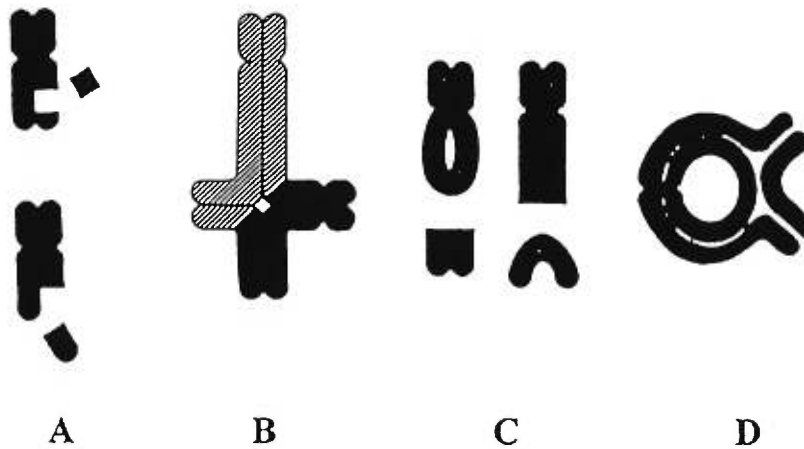


Figure 1.2: Représentation graphique d'exemples d'ACs telles qu'elles apparaissent en métaphase. AC de type chromosomique: A) translocation, B) dicentrique et fragment, C) anneau et fragment, D) cassure, E) délétion. AC de type chromatidien: A) cassures, B) tétrade, C) cassure isochromatidienne, D) remaniement asymétrique dans un bras d'une chromatide. Adapté de Brewen et Stetka (1982).

action S-indépendante (i.e., qu'elles produisent des aberrations dans toutes les phases du cycle cellulaire) ou S-dépendante (i.e., qu'elles dépendent de la synthèse de l'ADN pour manifester leur effet) (Léonard, 1990; Moore et Bender, 1993). Les substances S-indépendantes, telle que la bléomycine, agissent comme les radiations ionisantes et induisent des cassures dans les deux brins de l'ADN menant ainsi à la formation d'aberrations de type chromosomique en G1, de type chromatidien en G2 et un mélange des deux types en phase S. Les substances S-dépendantes, tel que la plupart des agents chimiques, agissent comme les rayons UV et produisent leurs effets à la phase S ou lorsque les cellules passent par la phase S entre l'exposition et l'observation de l'effet. Dans ce cas, les aberrations induites en S (observée à la mitose suivante) ainsi qu'en G2 (observées à la deuxième mitose après l'exposition) seront de type chromatidien.

Les aberrations de type chromosomique et chromatidien peuvent être subdivisées en plusieurs types tels que cassures, brèches et remaniements.

Les cassures sont définies par une discontinuité visuelle le long de l'axe longitudinal du chromosome. Il s'agit d'une interruption réelle de la chromatine avec des fragments clairement disloqués, incluant les fragments sans origine évidente (Evans, 1984). Ce groupe d'aberrations inclut aussi les délétions et les fragments acentriques (Evans, 1984; IPCS, 1985). Les délétions sont définies comme une perte de fragment chromosomique terminal ou interstitiel suite à une ou deux cassure(s), respectivement.

Les brèches, décrites initialement comme des lésions achromatiques résultant supposément de ruptures chromatidiennes incomplètes (Sax, 1938), ont été associées par des études séquentielles réalisées par microscopie optique et électronique à un étirement

gardant une étroite connection entre deux régions colorées de la chromatide, souvent non-visibles au microscope optique (Sheid et Traut, 1978; Mace et al., 1978). Ainsi, contrairement aux cassures, les brèches ne représentent pas de réelles discontinuités dans la chromatine. Bien que la signification de ces lésions ne soit guère comprise, les fêlures pourraient représenter des altérations ou défauts dans la spiralisation de la chromatine au niveau de la structure du chromosome, un site de mutation génique ou une brisure simple brin (Brogger, 1982; Fenech, 1997). Les brèches sont induites à une fréquence élevée par les agents qui inhibent la synthèse de l'ADN (Natarajan et Obe, 1982). Ce type de lésion peut être observé après une coloration simple au Giemsa.

Les remaniements sont des lésions de type chromatidienne ou chromosomique impliquant l'union balancée ou non-balancée, complète ou incomplète, de produits de ruptures chromatidiennes ou isochromatidiennes (Natarajan et Obe, 1982). Les remaniements non-balancés, tels que les triades, les tétrades et les fragments acentriques, sont des lésions instables car elles peuvent empêcher la cellule de se diviser ce qui entraîne normalement la mort cellulaire (Carrano et Natarajan, 1988). Les remaniements balancés, tels que les translocations réciproques et les inversions, sont des lésions stables qui n'induisent pas de perte du bagage génétique et peuvent donc être transmises aux cellules-filles à la mitose (Carrano et Natarajan, 1988). Par contre, ces remaniements balancés nécessitent des techniques de coloration de bandes chromosomiques pour leur identification exacte. Au contraire, les dicentriques et les chromosomes en anneau sont facilement reconnaissables après une coloration simple au Giemsa. Cette plus grande facilité d'observation est intéressante puisqu'il est reconnu qu'au moment ou peu après le

moment de l'exposition, les remaniements balancés sont présents en fréquence semblable à celle des remaniements non-balancés (Buckton et al., 1979; Carrano et Natarajan, 1988).

Selon le type d'agent mutagène en cause, différents types de lésions seront induites dans l'ADN. Ainsi, les cassures des brins d'ADN peuvent être produites en outre par les radiations, les UV et la bléomycine, des dimères de pyrimidine par les UV de courtes longueurs d'ondes, l'alkylation des bases par les agents alkylants, des liaisons intra- et inter-brins par les agents alkylants polyfonctionnels et les UV de longues longueurs d'ondes, et les agents intercalants (Natarajan, 1984). De telles lésions moléculaires ou primaires sont reconnues par des mécanismes de réparation de l'ADN et peuvent être corrigées ou transformées pour restaurer la séquence originale des bases ou encore produire des ACs et/ou des mutations géniques (IPCS, 1985). Les lésions primaires induites par les agents mutagènes doivent être des cassures bicaténares ou être transformées en de telles cassures afin d'être visualisées comme des ACs au microscope (IPCS, 1985; Savage, 1990; Moore et Bender, 1993).

Selon la théorie de Sax (1938), les cassures produites par les lésions primaires peuvent évoluer de façon diverses. Les extrémités peuvent se rejoindre à l'endroit de la cassure pour restaurer la configuration originale et ceci résultera en des chromosomes normaux. Bien que la plupart des cassures soient ainsi réparées, celles qui restent ouvertes donneront lieu à des cassures chromosomiques ou chromatidiennes. Des remaniements peuvent aussi se produire par l'union des extrémités de cassures localisées sur des chromosomes différents suffisamment proches dans le temps et l'espace. Quoique

la théorie de Sax demeure valable à ce jour, des études récentes suggèrent la nature plurimécanistique des ACs observées en métaphase. Les ACs seraient le résultat final d'une chaîne d'événements au cours de laquelle les lésions primaires ne seraient que les étapes d'initiation conduisant à l'apparition d'ACs. La proximité spatiale des lésions, le temps optimal d'exposition aux mutagènes et le mécanisme de condensation/décondensation de la chromatine sont quelques exemples des éléments impliqués dans cette chaîne d'événements (Evans, 1990; Savage, 1990; Moore et Bender, 1993; Savage, 1993).

Les aberrations chromosomiques numériques sont classées en deux catégories: la polyploïdie, qui implique un changement dans le nombre de chromosomes par un multiple exact du nombre haploïde ($1N$) de chromosomes, et l'aneuploïdie, qui implique un changement partiel dans le nombre diploïde ($2N$) de chromosomes (Oshimura et Barrett, 1986; Mitchell et al., 1995). Ces anomalies résultent essentiellement d'une interférence du mutagène avec les composantes de l'appareil mitotique, tels que les microtubules, les centrioles et les kinétochores, mais peuvent aussi impliquer comme cibles, pour les aneuploïdies, la membrane cytoplasmique et l'ADN (Oshimura et Barrett, 1986; Mitchell et al., 1995). La polyploïdie peut aussi être induite par d'autres mécanismes, tels que le blocage de la cytokinèse, la fusion nucléaire à l'intérieur d'une cellule binuclée, l'endomitose et l'endoréduplication (Önfelt, 1986; Schultz et Önfelt, 1994). L'importance de l'information génétique portée par les chromosomes manquants ou en surnombre détermine la capacité des cellules à survivre et se diviser (Léonard, 1990; Mitchell et al., 1995).

1.4.2 Les micronoyaux (MN)

Les MN sont des fragments chromosomiques ou des chromosomes entiers non-incorporés dans le noyau lors de l'anaphase mitotique et peuvent être observés dans le cytoplasme des cellules en interphase (Fenech et Morley, 1985). Ils résulteraient de cassures chromosomiques ou de la dysfonction de l'appareil mitotique (Fenech et Morley, 1985; Fenech, 1993). Afin d'analyser les MN de façon fiable, ils doivent être visualisés après la première division cellulaire suivant l'événement mutagène (Fenech et Morley, 1985). La technique de MN avec blocage de la cytokinèse (CBMN) a été développée pour reconnaître ces cellules et est maintenant utilisée de manière usuelle pour l'analyse des MN (Fenech et Morley, 1985; Fenech, 1997). Cette technique utilise la cytochalasine B (cyt-B) qui, lorsqu'elle est ajoutée aux cellules en culture avant la première mitose suivant l'événement mutagène, prévient la cytokinèse sans inhiber la division cellulaire et produit des cellules binuclées qui peuvent facilement être analysées pour la présence de MN (Fenech et Morley, 1985; Fenech, 1997).

Les mécanismes responsables des fragments chromosomiques et des chromosomes entiers à l'intérieur des MN sont les mêmes que ceux responsables des ACs. En effet, les ACs issues de cassures sont associées à des fragments acentriques qui peuvent se condenser et produire des MN (Evans, 1984). Il a été déterminé que l'essai de CBMN peut détecter 60% à 90% des fragments acentriques (Romalho et al., 1988; Littlefield et al., 1989). Le test des MN est plus rapide et demande une expertise moins grande que l'analyse des ACs et, par conséquent, est considéré une méthode plus pratique

pour l'analyse de dommages chromosomiques (Fenech, 1993). Bien que ce test ne puisse fournir une mesure spécifique des différents types d'ACs, ce niveau de détail n'est pas toujours nécessaire, par exemple lorsqu'on cherche simplement à déterminer s'il y a eu ou non induction de dommages chromosomiques (Evans, 1988; Heddle et al., 1991; Fenech, 1993).

L'aneuploïdie peut être causée par la non-disjonction de chromosomes résultant en une distribution inégale des chromosomes dans les cellules-filles après la division ou par la perte de chromosomes entiers (Fenech, 1997). L'analyse des MN est donc un outil pratique qui détecte, de façon globale mais non-sélective, les événements induits par les clastogènes et les turbagènes. Il a été démontré qu'environ la moitié des MN retrouvés de façon spontanée dans les lymphocytes et les fibroblastes humains sont des chromosomes entiers (Hennig et al., 1988; Thompson et Perry, 1988). La reconnaissance de chromosomes entiers à l'intérieur des MN peut être effectuée en utilisant des anticorps anti-kinétochores ou des sondes d'ADN qui reconnaissent les régions centromériques ou les chromosomes entiers (Hennig et al., 1988; Heddle et al., 1991; Elhajouji et al., 1997; Fenech, 1997).

De manière similaire aux ACs instables, les MN contenant des fragments chromosomiques seront perdus à la mitose car ils entraîneront fort probablement la mort cellulaire (Tucker et Preston, 1996). Il est donc présumé que ce type de MN ne s'accumulera pas lors d'une exposition chronique et ne persistera pas à la suite de cette exposition. Par contre, ils seront toujours présents pendant l'exposition chronique et peuvent donc servir de biomarqueurs à court terme. Au contraire, les MN contenant des

chromosomes entiers pourraient persister longtemps après l'exposition (Scarpato et al., 1990; Tucker et Preston, 1996).

1.4.3 Les échanges de chromatides-soeurs (ECSs)

Les ECSs ont été visualisées pour la première fois par autoradiographie chez les chromosomes de plantes par Taylor et al. (1957). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation des ECSs. Ces mécanismes impliquent soit une réplication altérée causée par des dommages aux bases de l'ADN ou soit un type de réparation post-répllicative de l'ADN (Bender et al., 1974; Kato, 1974; Shafer, 1977). Malgré qu'aucun des mécanismes proposés n'ait été démontré de façon concluante, il est généralement admis que les ECSs sont des échanges de brins d'ADN entre deux sites apparemment homologues de deux chromatides du même chromosome pendant la réplication de l'ADN endommagé (Perry et Wolff, 1974; Wolff, 1977; Latt, 1981; Carrano et Moore, 1982; Natarajan et Obe, 1982; Cleaver et al., 1996). Les topoisomérases seraient impliquées dans la réunion des brins lors de la formation des ECSs (Dillehay et al., 1989; Ribas et al., 1996). Les sites fragiles et les jonctions entre les fourches de réplication représenteraient des régions prédisposées à la formation d'ECSs (Painter, 1980; Glover et Stein, 1987; Lugo et al., 1989). Récemment, il a été postulé que les ECSs se produiraient de façon préférentielle dans les unités transcriptionnelles des gènes activement transcrits et impliqués de manière critique dans la survie cellulaire (Cleaver et al., 1996).

Les ECSs sont visualisées grâce à l'utilisation du 5-bromodéoxyuridine (BrdU) et à la technique de coloration Fluorescence-photolyse-Giemsa (FPG). Cette technique

permet aussi de distinguer les métaphases de première, de deuxième et de troisième division, ce qui permet l'analyse simultanée des ACs et des ECSs. Le BrdU est un analogue halogéné de la thymidine qui est incorporé lors de la duplication de l'ADN. L'incorporation du BrdU altère l'empaquetage de la molécule d'ADN, la rendant moins condensée et réduisant ainsi son affinité pour une coloration subséquente (Latt, 1973; Drouin et al., 1989). Par conséquent, une chromatide possédant seulement un brin d'ADN substitué au BrdU démontrera une plus grande affinité au colorant qu'une chromatide dont les deux brins ont été substitués. Après l'incorporation du BrdU et la technique FPG, les chromosomes des cellules en première division seront donc d'une coloration uniforme alors que ceux des cellules en deuxième division seront colorés de façon différentielle (patron de coloration harlequin, i.e., hybride foncé-clair) (Figure 1.3). Dû au fait que le BrdU produit lui-même une augmentation de la fréquence des ECSs reliée à la dose, la formation d'ECS *in vivo* est controversée (Kato, 1974; Latt, 1974; Lambert et al., 1976).

Les mécanismes impliqués dans la formation des ECSs seraient différents de ceux impliqués dans la formation des ACs (Perry et Evans, 1975; Savage, 1975; Carrano et Moore, 1982; Perry et Thompson, 1984). En effet, les études de corrélation entre les deux types de lésions ont fourni des résultats inconsistants (Perry et Thompson, 1984). Par contre, une petite proportion des aberrations chromatidiennes pourrait provenir d'ECSs incomplètes (Schubert et Meister, 1979). Contrairement aux ACs, qui sont induites de façon efficace par les substances capables de briser directement l'ADN, tels que les rayons ionisants, la bléomycine et les métaux lourds, les substances inductrices d'ECSs sont celles qui forment des adduits covalents sur l'ADN ou causent des distorsions des

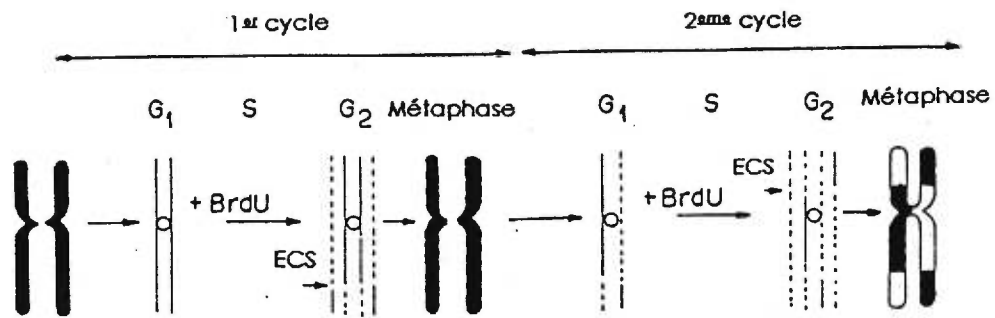


Figure 1.3: Représentation graphique de l'incorporation différentielle du BrdU dans les chromatides soeurs et la détection des ECSs. Adapté de Perry et Thompson (1984).

bases de l'ADN, tels que les UVs, les agents alkylants, les formes réactives des composés hydrocarbures aromatiques et certains analogues de bases, ou encore les substances qui interfèrent avec le métabolisme et la réparation de l'ADN (Perry et Evans, 1975; Wolff, 1977; Latt, 1981; Carrano et Moore, 1982; Perry et Thompson, 1984).

Même si le mécanisme exact de formation des ECSs demeure incompris, ce phénomène est considéré comme un indicateur extrêmement sensible à des niveaux peu élevés de dommages à l'ADN (Latt, 1974; Perry et Wolff, 1974; Perry et Evans, 1975; Lambert et al., 1976; Carrano et Moore, 1982). Des accroissements de la fréquence d'ECSs reliés à la dose ont été établis pour des centaines de composés dans des expériences *in vivo* et *in vitro* (Tucker et al., 1993). Bien que la présence d'ECSs n'implique pas nécessairement la présence de mutations somatiques, la relation entre ces deux événements a été proposée par plusieurs auteurs (Carrano et Moore, 1982; Natarajan et Obe, 1982; Nishi et al., 1984; Perry et Thompson, 1984; Tucker et Preston, 1996). La persistance des ECSs, et surtout des cellules avec des fréquences élevées d'ECS (High Frequency Cells-HFCs), a été observée expérimentalement dans les cellules humaines et animales *in vitro* et *in vivo* (Stetka et al., 1978; Hopkin et Evans, 1980; Carrano, 1982; Carrano et Moore, 1982).

1.4.4 Les lésions chromosomiques et le cancer

Presque la totalité des cancers sont associés avec des ACs structurales et/ou numériques spécifiques et/ou non-spécifiques (Yunis, 1983; Oshimura et Barrett, 1986; Evans, 1990; Sandberg, 1991; Solomon et al., 1991; Mitelman, 1994; Tucker et Preston,

1996). Plusieurs maladies héréditaires humaines (ataxia telangiectasia, anémie de Fanconi, syndrome de Bloom, etc.) sont associées avec une augmentation d'ACs et/ou d'ECSs et de l'incidence de cancer (German, 1972; Setlow, 1978; Carrano et Natarajan, 1988). Chez ces patients, le nombre de remaniements somatiques induits augmenterait considérablement la possibilité d'un remaniement chromosomique à l'origine d'un clone cellulaire malin (Germain et Bernheim, 1983). L'observation d'ACs chez ces patients a constitué un appui important à la théorie de l'implication de mutations somatiques dans l'étiologie du cancer proposée par Boveri en 1914. Des populations exposées aux radiations ionisantes (survivants de bombes atomiques) ou à des agents chimiques (e.g., chlorure de vinyl, benzène) considérés cancérigènes chez les humains par l'IARC ont des fréquences accrues d'ACs dans leurs lymphocytes (Carrano et Natarajan, 1988). L'augmentation de dommages chromosomiques dans les lymphocytes du sang pourrait donc refléter un risque accru de cancer dans les populations exposées (Carrano et Natarajan, 1988, Nordic Study Group, 1990, De Ferrari et al., 1991, Hagmar et al., 1994; Duffaud et al., 1997).

Parmi les nombreux remaniements somatiques détectés par l'analyse d'ACs, les translocations semblent être les plus communes dans l'étiologie des néoplasies (Mitelman, 1994). En effet, les translocations chromosomiques peuvent conduire à l'activation de proto-oncogènes, par exemple, la translocation entre les chromosomes 8 et 14 dans le lymphome de Burkitt ou encore entre les chromosomes 9 et 22 dans les leucémies myéloïdes chroniques (Mitelman, 1994). En plus des translocations, les délétions sont aussi impliquées dans, par exemple, les adénocarcinomes de plusieurs organes (ovaires,

vessie, utérus, prostate, poumons, colon, reins et glandes mammaires) (Sandberg, 1991; Solomon et al., 1991).

La relation entre les MN ou les ECSs et le risque de cancer n'est pas reconnue au même titre que celle établie pour les ACs. Les MN peuvent être induits par différents mécanismes et la nature des ACs à l'origine des MN est inconnue (Tucker et Preston, 1996). Néanmoins, l'aneuploïdie est impliquée dans plusieurs cancers et le mécanisme de formation des MN peut être connu à l'aide des techniques utilisées pour détecter la présence de centromères, tel que mentionné à la section 1.4.2. Certains auteurs ont démontré une relation entre l'induction d'ECSs et la transformation cellulaire *in vitro* ou l'induction de tumeurs *in vivo* (Popescu et al., 1981; M. Cheng et al., 1981). Dû au fait que les techniques d'AC, d'ECS et de MN mettent en évidence de façon différente les lésions à l'ADN, l'utilisation d'une batterie de ces tests comme biomarqueurs de génotoxicité sur une même population fournirait une information plus complète sur le risque de cancer chez cette population (Carrano et Natarajan, 1988).

1.5 GÉNOTOXICITÉ DU MERCURE, DES HAPs ET DES OCs

La capacité génotoxique du mercure sur les chromosomes a été démontrée dans plusieurs systèmes eucaryotes malgré que le mercure ait donné des résultats négatifs dans les tests d'induction de mutation ponctuelle chez les bactéries (Léonard et al., 1983; DeFlora et al., 1994). Le mercure peut causer des brisures simples brins dans l'ADN par son effet clastogène et la c-mitose en raison de son effet turbagène (DeFlora et al., 1994). La c-mitose (colchicine-mitose) est causé par l'inactivation partielle ou incomplète de

l'appareil mitotique par l'action de la colchicine et d'autres poisons de l'appareil mitotique qui résulte en des noyaux contenant un nombre de chromosome double ou des anaphases multi-polaires, respectivement (Rieger et al., 1991). Les mécanismes proposés pour expliquer la génotoxicité du mercure sont la liaison directe aux atomes d'azote des bases thymidines par les cations Hg^{2+} et $\text{CH}_3\text{Hg}^{2+}$, la production de radicaux libres, et la déplétion des réserves de glutathion et l'inhibition des enzymes de réparation de l'ADN par la liaison aux groupes sulfhydryles de ces protéines (Eichhorn, 1981; Morimoto et al., 1982; Cantoni et Costa, 1983; Cantoni et al., 1984; Snyder et al., 1988). Le MeHg et le Hg causent l'aneuploïdie, induite via la c-mitose, en se liant aux groupes sulfhydryles des protéines de tubuline de l'appareil mitotique (Oshimura & Barrett, 1986). Les effets indirects de la peroxydation lipidique, de la condensation accrue des chromosomes et de l'inhibition de la ARN polymérase 1 dans le cas du Hg, pourraient aussi jouer un rôle dans l'induction de l'aneuploïdie (Andersen et al., 1983; Önfelt, 1983; Verschaeve et al., 1985). Le Hg et le MeHg ont donné des résultats positifs dans les tests d'AC, d'ECS et de MN *in vitro* dans les cellules de mammifères (Morimoto et al., 1982; Betti et al., 1992; DeFlora et al., 1994; Ogura et al., 1996). Les études *in vivo* ont fourni des résultats contradictoires, mais certaines démontrent l'induction d'ACs, d'ECSs et de réparation non-programmée de l'ADN chez les mammifères (Miller et al., 1979; DeFlora et al., 1994). Des relations statistiquement significatives ont été retrouvées entre les concentrations totales de mercure dans le sang et la fréquence des ACs chez les humains consommant du poisson et des fruits de mer (Skerfving et al., 1974, Franchi et al., 1994).

Les HAPs sont des agents génotoxiques indirects qui sont métabolisés en des métabolites électrophiles très réactifs capables de se lier à l'ADN sous forme d'adduits (IARC, 1983). Le BP a été utilisé couramment comme contrôle positif dans les tests de génotoxicité (IARC, 1983). Le BP donne des résultats positifs dans les tests d'induction d'AC, d'ECS, de MN et de mutations somatiques, autant dans les cellules en culture que *in vivo* chez les mammifères (Hollstein et al., 1979; IARC, 1983; He et Baker, 1991; Nesnow et al., 1995; Warshawsky et al., 1995). Les HAPs multicycliques utilisés dans cet ouvrage, soit le benzo[*a*]anthracène (BA), le dibenzo[*a,h*]anthracène (DBA), le benzo[*b*]fluoranthène (BF) et le chrysène, sont tous mutagènes dans le test de AMES (IARC, 1983). Le BA et le DBA sont considérés actifs dans les tests à court terme de génotoxicité, tels que les tests d'ECS, d'AC, de MN et/ou de réparation non-programmée de l'ADN (IARC, 1983; Reddy et al., 1991; Crofton-Sleigh et al., 1993; Winker et al., 1995). Le BF et le chrysène sont moins actifs dans les tests de génotoxicité chromosomique que le BP, le BA et le DBA (IARC, 1983). Malgré que des résultats contradictoires aient été rapportés en ce qui concerne l'analyse des ACs, des études ont démontré que le BF et le chrysène sont positifs dans les tests d'ECS et de MN (IARC, 1983; He et Baker, 1991; Reddy et al., 1991; Winker et al., 1995). Des relations statistiquement significatives ont été retrouvées entre la pollution par les HAPs dans l'air et la fréquence d'ACs chez les humains (Perera et al., 1992).

Les mécanismes de génotoxicité des OCs sont peu connus. Contrairement au p,p'-DDT et au chlordane, le toxaphène est un électrophile naturel et possède donc une structure réactive pour l'ADN (Ashby et Tennant, 1991). Al-Sabti et Metcalfe (1995) et

Canonero et al. (1997) ont proposé que les OCs, tels que le DDT, le hexachlorobenzène et les biphényles polychlorés, pourraient agir comme tubagènes par l'inactivation du fuseau mitotique. Certaines études ont démontré que le chlordane est positif pour le test de réparation non-programmée de l'ADN et que certains congénères de biphényles polychlorés et leurs dérivés métabolites, qui ont une structure similaire au DDT, pourraient se lier à l'ADN et causer des lésions simples brins dans cette molécule (Ahmed et al., 1977; Safe et al., 1989). Par conséquent, il est aussi possible que les composés de DDT et de chlordane agissent au niveau de la molécule d'ADN (Hooper et al., 1979). Le toxaphène est reconnu comme un mutagène et est positif dans le test de AMES et d'ECS en absence de facteur métabolique externe S9 (Hooper et al., 1979; Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990; Ashby et Tennant, 1991). Des fréquences plus élevées d'ACs ont été observées chez des humains exposés de manière professionnelle au toxaphène (Samosh, 1974). Des résultats négatifs ont été obtenus pour le p,p'-DDT et son dérivé métabolique le p,p'-DDE dans la plupart des tests bactériens de mutagénicité, tandis que le chlordane est considéré un mutagène faible (Kelly-Garvet et Legator, 1973; Mamber et al., 1984; WHO, 1984; Reifferscheid et Heil, 1996). Bien que des résultats contradictoires aient été obtenus pour la génotoxicité du p,p'-DDT et du chlordane, il a été démontré que ces composés peuvent induire des ACs et/ou des ECSs *in vitro* et *in vivo* dans les cellules humaines et animales (Palmer et al., 1972; Grant, 1973; Larsen & Jalal, 1974; Lessa et al., 1976; Sobti et al., 1983; Sakar et al., 1993).

1.6 ÉTUDES ANTÉRIEURES SUR LES LÉSIONS À L'ADN CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS

Récemment, l'analyse de MN, d'ECSs et d'ACs ont été proposés comme biomarqueurs de l'exposition aux agents génotoxiques dans l'habitat naturel des poissons, des invertébrés, des mammifères terrestres et des phoques (DeFlora et al., 1991; AlSabti et Metcalfe, 1995; Hongell, 1996; Zúñiga et al., 1996). Des études ont démontré des fréquences plus élevées de MN, d'ACs et/ou d'ECSs chez des populations d'ongulés, de poissons et d'invertébrés exposées à des concentrations élevées d'HAPs, d'OCs et/ou de métaux lourds comparativement à celles exposées à des concentrations plus faibles de ces composés (Rubeš, 1987, De Flora et al., 1991, Rubeš et al., 1992, 1997, AlSabti et Metcalfe, 1995).

Les mammifères marins sont potentiellement exposés à des polluants génotoxiques dans leur environnement, mais seulement deux études se sont intéressées à cette question. Betti et Nigro (1996) ont démontré à l'aide de l'essai d'électrophorèse de cellule individuelle sur microgel (essai Comet) que des concentrations faibles (1 et 2 $\mu\text{g/ml}$) de MeHg induisent des brisures dans les brins d'ADN dans les lymphocytes de dauphin à gros nez. Hongell (1993) a analysé la fréquence d'ACs et d'ECSs dans les lymphocytes de bébés phoques gris et de phoques annelés (*Phoca hispida*) adultes de la mer de Baltique. Selon l'auteur, la présence d'ACs chez les phoques gris et, particulièrement la fréquence élevée retrouvée chez certains animaux, indique que ces phoques ont été exposés à des mutagènes dans leur environnement marin.

1.7 OBJECTIFS

Les objectifs de ce projet consistent à: 1) mettre au point des techniques de détection de lésions chromosomiques dans les cellules de mammifères marins, 2) évaluer la sensibilité *in vitro* des cellules de bélugas aux effets génotoxiques de divers contaminants environnementaux et 3) déterminer les fréquences de base de lésions chromosomiques retrouvées *in vivo* chez les bélugas et autres mammifères marins appartenant à des populations peu exposées aux polluants environnementaux afin de permettre, dans l'avenir, la mise en évidence de l'accroissement de ces fréquences chez des individus de même espèce appartenant à des populations fortement exposées.

1.8 CHOIX DU TYPE CELLULAIRE ET DES ESPÈCES DE MAMMIFÈRES MARINS

1.8.1 Études *in vivo*

La majorité des cancers, dont ceux observés chez les bélugas du St-Laurent, sont d'origine épithéliale (Martineau et al., sous presse; Cairns, 1975). Par contre, les cellules épithéliales des organes ciblés par le cancer sont difficiles ou impossibles à obtenir de façon non-invasive, particulièrement chez les mammifères marins. Les lymphocytes du sang périphérique sont considérés parmi les meilleures sources non-invasives de cellules pour analyser les lésions à l'ADN *in vivo* car 80% de ceux-ci circulent à travers tous les organes du corps et fournissent donc une estimation de l'exposition corporelle moyenne aux agents génotoxiques (Natarajan et Obe, 1982; Tucker et Preston, 1996). En effet, les

lésions à l'ADN sont encore présentes dans les lymphocytes lorsque ceux-ci sont stimulés à se diviser en culture, ce qui peut conduire à des lésions chromosomiques observables au microscope (Natarajan et Obe, 1982). La plupart de ces lymphocytes ont une longue durée de vie et une capacité relativement faible de réparation de l'ADN et peuvent donc accumuler des lésions chromosomiques suite à des expositions chroniques ou répétées (Carrano et Moore, 1982; Natarajan et Obe, 1982).

Les lymphocytes du sang sont presque exclusivement en phase G_0 du cycle cellulaire, phase au cours de laquelle les activités biochimiques et physiologiques de ces cellules sont grandement freinées (Natarajan et Obe, 1982). Les lymphocytes peuvent être stimulés à se diviser en culture de manière synchrone à l'aide d'antigènes ou de mitogènes (Natarajan et Obe, 1982). La concavoline A (conA), protéine de fève (*Canavalia ensiformis*) qui stimule préférentiellement les lymphocytes T (Elderman et al., 1972; Natarajan et Obe, 1982), est le mitogène le plus actif pour les lymphocytes de bélugas et de dauphin à gros nez (Lahvis et al., 1993; DeGuise et al., 1996). La facilité d'obtention de ces cellules, leur multiplication facile en culture et leur stabilité caryotypique sont aussi des avantages qui font des lymphocytes un excellent modèle pour la détection de dommages chromosomiques (Evans, 1984).

Les populations de mammifères marins utilisées pour les analyses *in vivo* des niveaux de base de lésions chromosomiques ont été sélectionnées pour leur faible niveau d'exposition aux polluants environnementaux, la facilité d'obtention des lymphocytes du sang, et la disponibilité d'informations sur les caractéristiques biologiques des individus. Les espèces de mammifères marins ont été choisies pour la présence, dans le milieu

naturel, à la fois de populations faiblement et fortement exposées aux contaminants environnementaux, afin de permettre des comparaisons ultérieures des fréquences des lésions chromosomiques entre ces deux types de populations.

Les bélugas et les phoques gris utilisés dans cette étude sont des animaux maintenus en captivité pour lesquels l'âge, le sexe, le statut et l'historique de reproduction ainsi que l'état de santé sont connus. Il est normalement difficile d'obtenir de telles informations pour les populations sauvages de mammifères marins, en particulier les cétacés. Cependant, les dauphins à gros nez de la baie de Sarasota sont étudiés depuis près de 30 ans et des informations sur l'âge, le sexe, les relations génétiques, l'historique de reproduction, la condition corporelle, les paramètres biochimiques et hématologiques du sang, les concentrations d'OCs, d'hormones et de vitamines, et les fonctions immunitaires ont été récoltées à partir d'échantillons de sang d'individus connus.

Il aurait été intéressant de pouvoir comparer les valeurs de dommage chromosomique obtenues pour les bélugas de l'arctique avec ceux du St-Laurent. Cependant, il a été impossible de capturer et d'échantillonner le sang des bélugas du St-Laurent.

1.8.2 Études *in vitro*

Pour les analyses *in vitro*, les lymphocytes du sang périphériques de bélugas n'étaient pas disponibles en assez grand nombre. Les fibroblastes étant les cellules majeures du tissu conjonctif des organes et des tissus corporels, ils sont donc omniprésents dans l'organisme (Barlovatz-Meimon et Martelly, 1988). Les fibroblastes ont été utilisés couramment dans des études de génotoxicité réalisées pour l'analyse de MN ainsi qu'avec

d'autres tests cytogénétiques. Des souris injectées i.p. avec du MeHg *in vivo* ont démontré une augmentation d'ACs dans leurs fibroblastes de peau (Gilbert et al., 1983), ce qui démontre que les fibroblastes pourraient servir de succédané des lymphocytes pour mesurer un effet d'une exposition sur les organes cibles. Ainsi, des cultures de fibroblastes de bélugas ont été utilisées pour le volet portant sur les analyses *in vitro* de génotoxicité de cet ouvrage. Les cultures de fibroblastes ont été établies à partir de petits échantillons de biopsie et ont proliféré de façon vigoureuse en culture. Par conséquent, ces cellules ont démontré un bon potentiel pour l'analyse des lésions à l'ADN induites *in vitro* par les contaminants environnementaux chez cette espèce.

CHAPITRE 2

MISE AU POINT DES MÉTHODES

Cette thèse étant présentée sous forme d'articles, le détail des diverses approches méthodologiques utilisées se retrouve dans les articles présentés aux chapitres 3 à 6. Cependant certaines étapes préliminaires de mise au point des méthodes ont dû être effectuées. Ces étapes font l'objet du présent chapitre. Dans un premier temps, ce chapitre présente les points importants de la mise au point des techniques de culture cellulaire et des techniques cytogénétiques appliquées aux lymphocytes (pour les études *in vivo*) et aux fibroblastes (pour les études *in vitro*) des mammifères marins étudiés dans cet ouvrage. Dans un deuxième temps, ce chapitre présente les résultats de l'établissement de cultures primaires de fibroblastes à partir de tissus de peau et d'organes de bélugas.

2.1 Lymphocytes

L'utilisation de méthodes standardisées est essentielle pour maximiser la sensibilité des techniques de détection des lésions à l'ADN (Natarajan et Obe, 1982). Plusieurs paramètres de culture, tels que la concentration de lymphocytes, le lot de sérum de veau foetal (SVF) et la concentration de la cyt-B, du BrdU et de la colchicine, peuvent faire varier les résultats des tests cytogénétiques (Carrano et Moore, 1982; Perry et Thompson, 1984). Par exemple, le lot de SVF peut influencer la fréquence spontanée d'ACs et d'ECSs et ceci a été attribué aux concentrations variables de superoxyde

dismutase dans le SVF (Baret et Emerit, 1983; Carrano et Moore, 1982; Carrano et Natarajan, 1988). Il est donc important de mettre au point les paramètres de culture et de conserver les mêmes dans toutes les expériences.

Les lymphocytes provenant de rate congelée de béluga et ceux obtenus du sang périphérique frais de béluga et de phoque du Groenland ont été utilisés pour déterminer les paramètres de culture et mettre au point les techniques d'ACs, d'ECSs et de MN pour les lymphocytes du sang de ces mammifères marins ainsi que les dauphins à gros nez. Les lymphocytes de rates ont été échantillonnés par le Dr S. DeGuise sur des carcasses de bélugas tués par des chasseurs inuits, congelés dans l'azote liquide dans du SVF contenant 10% de diméthyl sulfoxide (DMSO), et dégelés avant usage dans un bain-marie à 37°C. À cause de la rareté et de la petitesse des échantillons de lymphocytes de rate et du sang de mammifères marins, ces expériences de mise au point ont dû être effectuées selon la disponibilité des échantillons. La mise au point des paramètres des méthodes, tel que le choix de la concentration cellulaire, de la concentration de conA et de cyt-B, du temps de traitement hypotonique, de la fixation et de la technique de FPG, a donc été effectuée selon l'espèce disponible, avec de faibles effectifs (n= 1 à 5) et sans analyse statistique. Les éléments utilisés pour la mise au point de ces paramètres comprenaient la détermination de l'indice mitotique, de l'indice de prolifération après blocage de la cytokinèse et/ou du % de cellules BNs et la qualité des préparations sur lames.

L'utilisation d'une concentration cellulaire de 3×10^6 cellules/ml a permis d'obtenir un IM plus élevé et un plus grand nombre de cellules sur lame que lorsque les cellules étaient incubées à 2×10^6 cellules/ml (Tableau 2.1). Une concentration élevée de SVF

Tableau 2.1: Effet de la concentration cellulaire sur la stimulation par la conA de la prolifération de lymphocytes de rate de deux bélugas.

	Concentration cellulaire ($\times 10^6$ cellules/ml)	
	2	3
IM	0.55 \pm 0.36	0.74 \pm 0.11

étaient incubées à 2×10^6 cellules/ml (Tableau 2.1). Une concentration élevée de SVF (20% du milieu de culture) a été utilisée afin de maximiser le niveau de nutriments présents en culture pour les lymphocytes. La concentration de conA produisant le taux de prolifération le plus élevé variait selon les expériences entre 2 et 12 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 2.2). Le pourcentage de cellules BNs était plus élevé aux concentrations de cyt-B entre 4.5 et 9 $\mu\text{g/ml}$ qu'à celles de 1.5 et 3 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 2.3). Cependant les résultats variaient peu entre 4.5 et 9 $\mu\text{g/ml}$ de cyt-B, sauf que le pourcentage de cellules BNs était moins élevé à 6 $\mu\text{g/ml}$ qu'à ces autres concentrations. Puisque des résultats contradictoires ont été obtenus pour la mise au point de la concentration de conA et de la cyt-B et que l'effectif d'échantillon utilisé dans ces expériences était faible, les concentrations de ces composés utilisés dans cet ouvrage ont été fixées à l'aide des données de la littérature. Des études antérieures de prolifération lymphocytaire réalisées chez les bélugas et les dauphins à gros nez, ont démontré que les concentrations optimales de conA se situaient entre 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$ de conA (Lahvis et al., 1993; DeGuise et al., 1996). D'après Surrallés et al. (1992), la cyt-B à une concentration de 6 $\mu\text{g/ml}$ bloque plus efficacement la cytokinèse chez les lymphocytes humains qu'à 3 $\mu\text{g/ml}$, ce qui résulte en un taux plus élevé de cellules BNs nécessaires pour l'analyse des MN à 6 $\mu\text{g/ml}$. Les concentrations de conA et de cyt-B ont donc été fixées respectivement à 4 et 6 $\mu\text{g/ml}$. Ces concentrations ont permis d'obtenir une prolifération cellulaire et un nombre de métaphases et de cellules BNs suffisants pour effectuer les tests de MN, d'ECS et d'AC (voir les tableaux 6.2 à 6.4), tout en minimisant les risques de toxicité cellulaire de ces composés. Les concentrations de BrdU et de colchicine ont été fixées selon l'usage le plus répandu dans la littérature, soit 6 $\mu\text{g/ml}$ et

Tableau 2.2: Effet de la concentration de conA sur la stimulation de la prolifération de lymphocytes de rate de bélugas et de lymphocytes du sang de phoques du Groenland. Les résultats proviennent de quatre expériences. Les résultats d'IM, de IPBC et de % de cellules BNs sont exprimés comme la moyenne de tous les animaux testés et de tous les réplicas (n= nombres d'animaux testés x nombres de réplicas).

Paramètres des 4 expériences	Concentration de conA ($\mu\text{g/ml}$)					
	1	2	4	8	12	16
Nb. bélugas	---	---	1	1	1	1
Nb. réplicas	---	---	1	3	5	3
IM	---	---	0.17	0.49 \pm 0.36	0.76 \pm 0.12	0.44 \pm 0.12
Nb. bélugas	---	---	---	2	2	---
Nb. réplicas	---	---	---	1	1	---
IPBC	---	---	---	1.06 \pm 0.00	1.06 \pm 0.01	---
% cellules	---	---	---	5.29 \pm 0.11	4.79 \pm 0.35	---
BNs						
Nb. phoques	2	1	2	1	---	---
Nb. réplicas	1	1	1	1	---	---
IM	0.71 \pm 0.66	2.06	0.95 \pm 0.25	1.07	---	---
Nb. phoques	2	1	2	1	---	---
Nb. réplicas	1	1	1	1	---	---
IPBC	1.23 \pm 0.08	1.33	1.31 \pm 0.11	1.41	---	---
% cellules	21.5 \pm 7.8	30	27.8 \pm 8.8	35	---	---
BNs						

Tableau 2.3: Effet de la concentration de la cyt-B sur les lymphocytes du sang de bélugas en présence de 4 $\mu\text{g/ml}$ de conA. Les résultats sont présentés comme la moyenne des résultats pour deux animaux.

	Concentration de cyt-B ($\mu\text{g/ml}$)					
	1.5	3	4.5	6	7.5	9
% cellules	23.6 \pm 6.9	24.5 \pm 7.8	33.8 \pm 2.3	27.9 \pm 0.2	35.0 \pm 0.71	35.6 \pm 1.9
BNs						

0.16 µg/ml, respectivement. Le même lot de SVF fut utilisé pour toutes les analyses *in vitro* et des lots de SVF considérés très semblables par le fournisseur (Gibco) ont été utilisés pour tous les tests *in vivo*.

Le traitement hypotonique au KCl 0.075M et la fixation sont d'importants facteurs affectant la préservation du cytoplasme et le gonflement adéquat des cellules, ainsi que la qualité générale des préparations. Le cytoplasme doit être éliminé pour l'observation des ACs en métaphase, mais préservé pour l'analyse des MN. Plusieurs essais ont démontré que les meilleurs résultats obtenus pour les temps de traitement au KCL étaient de 5 minutes pour les préparations utilisées pour l'analyse des MN et de 25 minutes pour les préparations de chromosomes en métaphase. Le fixateur normalement utilisé en cytogénétique consiste en un mélange de méthanol et d'acide acétique dans les proportions de 75:25. Puisque la préservation du cytoplasme dans l'essai MN n'était pas toujours obtenue, différentes proportions ont été testées. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque les lames étaient fixées avec un mélange de méthanol et d'acide acétique dans les proportions 85:15. De plus, en ce qui concerne la première fixation pour les lames du test de MN, le fixateur a été ajouté directement dans la solution hypotonique de KCl afin d'en diminuer l'effet. Cette méthode de fixation plus douce a permis une meilleure préservation du cytoplasme des cellules BNs.

En ce qui concerne les ECSs, l'intensité de la coloration différentielle des chromosomes en métaphase était variable et parfois de faible qualité. Comme la chaleur augmente l'intensité des UVs et le contraste entre les deux chromatides soeurs colorées à l'aide de la technique FPG (Ockey, 1980), l'étape d'exposition aux UVs de la technique de

FPG a été effectuée à une température de 37°C, au lieu d'effectuer cette étape à la température de la pièce. Ceci a permis d'obtenir une meilleure qualité de coloration différentielle des chromosomes.

2.2 Fibroblastes

En raison des quantités limitées de lymphocytes de bélugas, des cultures de fibroblastes primaires ont été amorcées afin d'effectuer les expériences *in vitro* de cet ouvrage. La mise en culture des fibroblastes a été effectuée selon les méthodes décrites au chapitre 3. Dix cultures de fibroblastes primaires ont été établies à partir d'échantillons de peau ou de rein de bélugas de l'arctique et du St-Laurent (Tableau 2.4). La première visualisation de cellules (temps d'initiation) s'est produite de 2 à 10 jours suivant l'amorce de la plupart des cultures (Tableau 2.4). Le taux de succès global (nb de cultures établies / nb de cultures amorcées) était de 57.9%.

Plusieurs facteurs ont pu influencer ce taux de succès, tels que le type de tissu utilisé, l'âge de l'animal, la fraîcheur de l'échantillon (temps post-mortem et carcasses versus biopsies), et la préservation de l'échantillon (frais versus congelé). La majorité des cultures furent établies à partir d'échantillons de peau, car ce tissu de revêtement était mieux préservé que les organes après la mort de l'animal. Le taux de succès des cultures initiées à partir de peau (71.4%) était supérieur à celui des cultures amorcées à partir de rein (33.3%) et de poumon (0%). Parmi les échantillons de peau, le taux de succès était de 60.0% pour les échantillons provenant de carcasses retrouvées approximativement de 1 à 7 jours après la mort de l'animal, de 100% pour les biopsies prises sur des animaux

Tableau 2.4: Caractéristiques des cultures de fibroblastes de bélugas. Toutes les cultures ont été initiées à partir d'échantillons de tissus frais, à l'exception des cultures ATP-95-1 à 8 qui ont été effectuées à partir de tissus congelé.

Nom	Sexe	Âge/groupe d'âge (années)*	T. post- mortem (~jours)	Succès*	Délai* (jours)	Nb. pas- sages*	Nb. fioles congel. [◊]
SCP-95-1	M	0	7	non	∞	0	0
SCL-95-2	F	0	1	non	∞	0	0
SCP-95-2	F	0	1	non	∞	0	0
SCR-95-2	F	0	1	oui	10	9	24
SCL-95-3	M	26+	2	non	∞	0	0
SCP-95-3	M	26+	2	oui	2	5	12
SCR-95-3	M	26+	2	non	∞	0	0
SCP-95-4	M	11	4	oui	2	5	37
SCP-96-1	M	21+	2	oui	3	5	9
SCR-96-1	M	21+	2	non	∞	0	0
SBP-95-1	M	adulte	vivant	oui	2	6	8
SBP-95-2	M	adulte	vivant	non	30	2	0 [§]
[†] ATP-95-1	M	jeune	0	non	∞	0	0
ATP-95-2	M	jeune	0	oui	3	4	9
ATP-95-3	M	jeune	0	oui	32	3	4
ATP-95-4	M	jeune	0	oui	5	4	10
ATP-95-5	F	adulte	0	non	∞	0	0
ATP-95-7	M	jeune	0	oui	5	4	10
ATP-95-8	M	adulte	0	oui	<7	12	22

Nom: A= béluga de l'arctique, S= béluga du St-Laurent, B= biopsie d'animal vivant en liberté, C= échantillon de carcasse, T= biopsie d'animal fraîchement tué, L= poumon, P= peau, R= rate, 95= 1995, 96= 1996. Le numéro à la suite de l'année correspond à celui du béluga pour l'année indiquée.

*: Les âges ont été déterminés à partir des couches de croissance dans les sections de dents (Sergeant, 1973). Les groupes d'âge ont été estimés selon les données publiées sur les longueurs des bélugas à l'âge adulte de la région de l'arctique de l'ouest de la baie d'Hudson (Breton-Provencher, 1982) et la couleur de leur peau. Le chiffre 0 indique que l'animal était un nouveau-né. Les jeunes sont âgés de 3 à 5 ans pour les femelles et 3 à 8 ans pour les mâles (Breton-Provencher, 1982).

*: Le délai correspond au temps écoulé avant la première visualisation de fibroblastes en culture.

°: Le succès est positif si le délai n'est pas ∞.

*: Nombre de passages maximum qu'on effectué les fibroblastes.

◇: Nombre de fioles de fibroblastes congelées dans l'azote liquide.

∞ : Indique qu'aucun fibroblaste n'était visible lorsque les cultures ont été jetées 4 à 7 semaines après l'initiation des cultures.

§: Jeté car sa croissance était très lente.

‡: Les bélugas de l'arctique ont été échantillonnés en moins d'une heure ou quelques heures après la mort.

vivants en liberté, et de 71.4% pour les biopsies prises sur des animaux fraîchement tués par des chasseurs Inuits (Tableau 2.4). Cependant, deux cultures provenant de biopsies de peau (SBP-95-2 et ATP-95-3) ont montré un long délai et une croissance lente. Selon les données recueillies, l'âge, le temps post-mortem et la congélation des échantillons, ne semblent pas avoir influencé ni le temps d'initiation des cultures, ni le taux de succès des cultures (Tableau 2.4). Cependant, un plus grand effectif d'échantillonnage serait nécessaire afin de vérifier de manière plus approfondie ces hypothèses.

Les paramètres de culture et de la technique des MN pour les fibroblastes ont été mis au point de manière qualitative. Les cultures de fibroblastes ont été effectuées avec 15% de SVF. À cause de la croissance vigoureuse des fibroblastes, la concentration de SVF a ensuite été réduite à 10%. La cyt-B a été utilisée à la même concentration que pour les lymphocytes. Il n'a pas été nécessaire d'utiliser l'agent hypotonique KCL 0.075M pour les préparations de fibroblastes puisque l'aspect des cellules était semblable lorsque les préparations étaient traitées ou non avec cette solution. La fixation des fibroblastes a été réalisée de la même manière que celle des lymphocytes. Par contre, la fixation des fibroblastes fut effectuée *in situ*.

Contrairement au bélugas du St-Laurent, les bélugas de l'arctique sont peu exposés à la contamination environnementale dans leur milieu naturel. Les fibroblastes de béluga de l'arctique ont donc été sélectionnés pour les expériences *in vitro* de MN afin d'éviter le plus possible les effets potentiels de l'exposition aux polluants environnementaux *in vivo* sur les activités cellulaires *in vitro*. Seulement une des cultures de fibroblastes de béluga de l'arctique (ATP-95-8) a été utilisée pour les expériences *in vitro* de MN, car au

moment de ces expériences, seuls les fibroblastes de l'échantillon ATP-95-8 étaient dotés de croissance suffisante pour suffire aux besoins de ces expériences.

Les fibroblastes du béluga de l'arctique ATP-95-8 ont été utilisés pour l'analyse de l'induction *in vitro* des MNs par: 1) le Hg et le MeHg sans agent métabolique externe (chapitre 3, article I); 2) le BP et un mélange d'HAPs en présence d'agent métabolique externe S9 (chapitre 4, article II); 3) le toxaphene, le DDT et le chlordane avec et sans agent métabolique externe S9 (chapitre 5, article III). Les fibroblastes ATP-95-8 ont été exposés à ces composés dans le cadre d'une seule méga-expérience.

CHAPITRE 3

ARTICLE I

ANALYSE DES MICRONOYAUX INDUITS PAR LE MERCURE DANS LES FIBROBLASTES DE PEAU DE BÉLUGAS

"Mercury induced micronuclei in skin fibroblasts of beluga whales"

sous presse dans *Environmental Toxicology and Chemistry*

Julie M. Gauthier*, Hélène Dubeau and   ric Rassart

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec    Montréal, C. P. 8888,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

*To whom correspondence may be addressed. E-mail: c2656@er.uqam.ca.

ABSTRACT

Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) inhabiting the St. Lawrence estuary are highly contaminated with environmental pollutants and have a high incidence of cancer. Environmental contaminants may be partly responsible for the high cancer incidence observed in this population. DNA damage plays an important role in the development of cancer. The micronuclei (MN) assay was used to test the genotoxic potential of mercury compounds in skin fibroblastoid cells of an Arctic beluga whale. Both mercuric chloride (Hg) and methylmercury (MeHg) induced a highly significant ($p \leq 0.001$) dose-response increase of micronucleated cells. Statistically significant increases in micronucleated cells were observed for 0.5, 5 and 20 ug/ml Hg and 0.05, 0.5 and 2 ug/ml MeHg when compared

to control cultures. Concentrations of 0.5, 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg respectively induced a 2-, 3- and 4-fold increase of micronucleated cells. Treatment with MeHg was an order of magnitude more potent in inducing MN and in inhibiting cell proliferation than Hg. Although results of this *in vitro* study do not imply that mercury compounds are involved in the etiology of cancer in St. Lawrence beluga whales, significant increases in MN frequency were found at low concentrations of MeHg (0.05 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ MeHg) that are believed to be comparable to concentrations present in certain whales of this population.

Keywords

Beluga whale, St. Lawrence estuary, mercury, micronuclei, skin fibroblasts.

INTRODUCTION

Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) of the St. Lawrence estuary form a small endangered population according to the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada (COSEWIC). Necropsies of dead stranded whales have shown a high prevalence of tumours, non-neoplastic lesions and opportunistic diseases (Martineau et al., 1994; DeGuise et al., 1995). Cancer has been diagnosed as the principal cause of death in 18% of 97 examined carcasses and the annual crude cancer rate was estimated to be 233/100 000; higher than in most human and domestic animal populations (Martineau et al., in press; D. Martineau, personal communication). Population modelling, field studies and necropsy observations of female reproductive organs have suggested a lower reproductive rate in this population than in Arctic populations (reviewed by Béland et al. 1993). High concentrations

of environmental contaminants, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine compounds and mercury, and presence of benzo(*a*)pyrene DNA adducts have been found in tissues of St. Lawrence beluga whales (Muir et al., 1990; Wagemann et al., 1990; Martineau et al., 1994; Muir et al., 1996). On the contrary, Arctic beluga whales have low concentrations of environmental contaminants (Wagemann et al., 1990; Muir et al., 1996) and no gross evidence of cancer has been found in approximately 50 carcasses sampled for routine biological purposes (D. J. St. Aubin, personal communication). Factors such as tumour induction, tumour promotion and immunosuppression induced by environmental contaminants have been proposed to explain the elevated cancer incidence in the St. Lawrence population (Martineau et al., 1994; DeGuise et al., 1995).

DNA damage plays an important role in the development of cancer and can be a risk factor for teratogenesis and genetic disease (Oshimura and Barrett, 1986; Tucker and Preston, 1996). Mercury compounds are highly toxic, widespread and long-lived bioaccumulating agents (Miura and Imura, 1987; Thompson, 1990), which have genotoxic and teratogenic activities (Hemmniki and Vineis, 1985; DeFlora et al., 1994). Both inorganic and organic forms of mercury have been shown to induce DNA damage at the chromosomal level in cells of humans, domestic animals and wildlife (reviewed by DeFlora et al. 1994). MeHg is a carcinogen in experimental animals and is considered possibly carcinogenic to humans (IARC, 1993).

The mammalian cytokinesis-block micronuclei (MN) assay is a well known cytogenetic technique used to assess DNA damage induced by environmental contaminants (Fenech, 1993). MN are chromosomal fragments or whole chromosomes that are not

incorporated into daughter nuclei during mitosis because of chromosomal breakage or whole chromosome loss (i.e., aneuploidy), respectively (Fenech, 1993). Cytochalasin B prevents cytokinesis and produces binucleated (BN) cells which can be easily scored for MN (Fenech and Morley, 1985). The MN assay is an ideal test for the detection of mercury induced genotoxicity because mercury compounds can induce both chromosomal breakage and aneuploidy (DeFlora et al., 1994).

Very few studies exist on the genotoxic effects of environmental contaminants in marine mammals. Recently, induction of single-strand breakage by MeHg has been demonstrated *in vitro* in lymphocytes of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) (Betti and Nigro, 1996). In this study, primary skin fibroblastoid cells of an Arctic beluga whale were used to test the sensitivity of these cells to the genotoxic effects of mercuric chloride (Hg) and MeHg at concentrations relevant to those found in St. Lawrence beluga whales.

METHODS

Cell culture

Primary beluga whale (*D. leucas*) fibroblasts were isolated from a skin biopsy sample taken by S. DeGuise from a subadult or adult (3.9 m) male Arctic beluga whale collected by subsistence Inuvialuit hunting at Arviat, west Hudson Bay, Canada. The biopsy skin sample was placed in fetal calf serum (Gibco) containing 10% dimethyl-sulphoxide (DMSO) in a cryopreservation vial and stored in liquid nitrogen until use. The skin sample was thawed, placed in a 60 mm plastic Petri dish, rinsed several times in phosphate buffered saline (PBS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco), sliced into small pieces with a scalpel and

rinsed again. The sample was then transferred to an Erlenmeyer flask and dispersed twice for 20 min with a magnetic stirrer at 37°C in PBS containing 0.125% trypsin and 1.33 mM EDTA (Gibco). Following each of the treatments with trypsin, the cell suspension was pipetted into a centrifuge tube and fetal calf serum was added to arrest treatment. The pooled cell suspensions were centrifuged at 1900 rpm for 20 min and the cell pellet resuspended in modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with penicillin-streptomycin and 15% fetal calf serum in a 60 mm Petri dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The medium was replenished after 24 h and cells were maintained thereafter by changing the medium every 1 to 2 days. The same serum batch was used during the whole course of the study.

Treatment and slide preparation

Experiments were performed using pooled exponentially growing cells at passages 7 to 10. Confluent cultures were trypsinized and cells were seeded at 5×10^5 cells/ml on sterilized microscopic slides placed individually in 100 mm Petri dishes and incubated for 48 h. Mitomycin C (MMC) (Sigma) and Hg (generously donated by F. Denizeau) were dissolved in sterile distilled water (Gibco, Burlington, ON, CAN) and MeHg (Ultra Scientific, distributed by VWR, Mississauga, ON, CAN) was dissolved in DMSO. Distilled water or DMSO was used as negative controls and MMC was used as the positive control. Final distilled water and DMSO concentrations were 1% for all cultures. Cells were treated (3 replicates per culture) with MMC for 3 h and Hg or MeHg for 24 h, at concentrations shown in Tables 3.1 and 3.2. Range of experimental doses were chosen according to those

expected to be found in the St. Lawrence beluga whales and according to preliminary cell-killing dose-response experiments. The medium were then aspirated and replaced by fresh medium containing 6 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (Sigma, Oakville, ON, CAN) and cells were incubated another 48 h. Cells were fixed in situ once with half PBS and half methanol:acetic acid (4:1) and twice with methanol:acetic acid (4:1, v/v), air dried and stained with 10% Giemsa (Sigma) for 30 min.

MN Analysis

MN were scored according to established criteria (Countryman and Heddle, 1976), with the following specifications: 1) cells were scored only if there was intact cytoplasm, a distinct nuclear membrane and little or no debris and overlap with adjacent cells, 2) no more than four MN within a BN cell was scored, and 3) MN were scored only if their texture and focal plane was similar to that of main nuclei and if there was absence of a bridge between the MN and main nuclei. However, MN which overlapped the boundaries of the main nuclei were scored (Fenech, 1993), if the complete membranes of both objects could be readily distinguished by transparency. The cytokinesis-blocked proliferation index, which measures the average number of cell cycles per cell, were calculated for each treatment as $\text{CBPI} = 1(\text{M1}) + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3} + \text{M4}) / \text{N}$, where M1 to M4 represent the number of cells with 1 to 4 nuclei and N is the total number of cells scored (Surrallés et al., 1995). For each treatment, at least 1000 binucleated (BN) cells were scored for MN at 400X magnification and presence of MN was confirmed at 1000X magnification.

Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare CBPI and frequency of micronucleated BN cells for each treatment with the respective control. Regression analysis was performed to test for dose-response relationships for each test compound, where the Y axis represents either the CBPI or frequency of micronucleated BN cells and the X axis represents the concentration of the compound. All statistical analyses were conducted using Minitab (Minitab software, release 8, State College, PA, USA).

RESULTS

Typical BN cells with and without a MN are shown in Figure 3.1. Results for MN induction and CBPI in beluga whale skin fibroblasts treated *in vitro* with MMC, Hg and MeHg are summarized in Tables 3.1 and 3.2. CBPI and micronucleated cell frequency in distilled water or DMSO control cultures of beluga whale skin fibroblasts were similar and ranged from 1.48 to 1.59 and 5 to 11 ‰ BN cells, respectively (Table 3.2).

A significant increase in micronucleated cell frequency was found for all tested concentrations of positive control MMC (Table 3.2). Treatment with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ MMC induced a 2.0-fold mean increase in micronucleated cells, while both 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ concentrations induced a similar mean increase in micronucleated cells of about 6-folds when compared to distilled water control. MMC treatment caused a highly significant dose-response increase in micronucleated cells ($y = 14.7 + 19.0x$, R^2 adjusted = 68.7%, $p < 0.001$), which was accompanied by a significant decrease in CBPI ($y = 1.49 - 0.138x$, R^2 adj. = 59.9%, $p = 0.002$) (Figure 3.2).

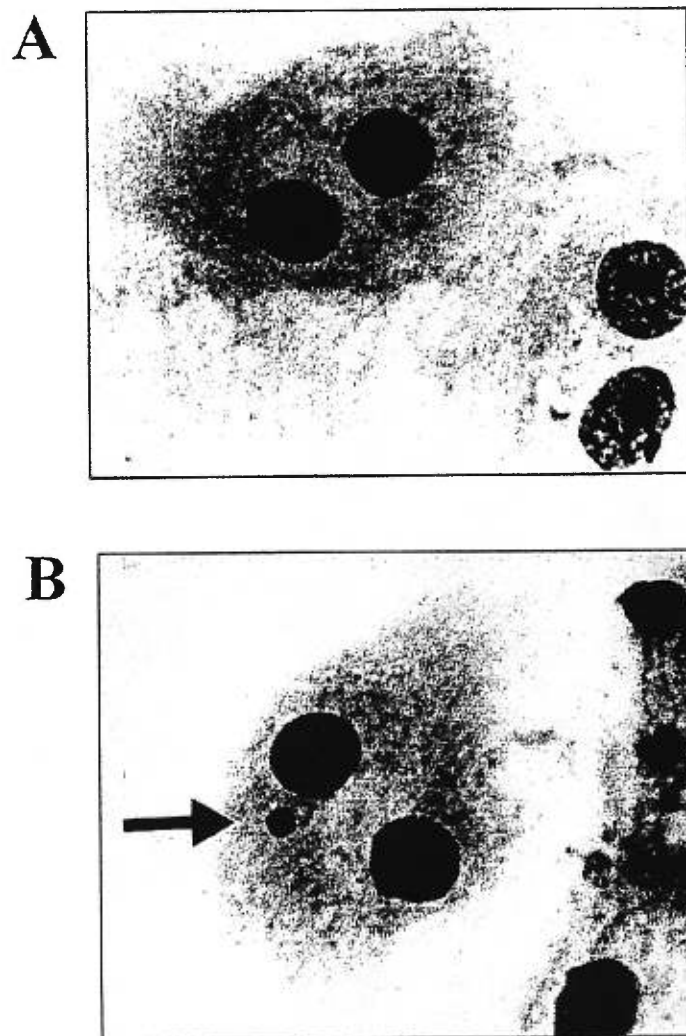


Figure 3.1: Typical binucleated beluga whale skin fibroblast without (A) and with (B) a MN. The MN is indicated by the arrow.

Table 3.1: Distribution of cells with different numbers of nuclei, proliferation index (CBPI) and ANOVA results for beluga whale skin fibroblasts treated *in vitro* with MMC, Hg and MeHg.

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	replicate	Cells with indicated number of nuclei / 1000				CBPI	mean \pm SD	P value ^a
		cells						
		1	2	3	4			
H ₂ O								
1%	1	457	533	8	2	1.55		
	2	423	563	12	2	1.59		
	3	437	554	7	2	1.57	1.57 \pm 0.02	---
DMSO								
1%	1	451	530	11	8	1.57		
	2	530	456	8	6	1.48		
	3	456	531	10	3	1.57	1.54 \pm 0.05	0.404 ^b
MMC								
0.1	1	578	418	4	0	1.43		
	2	518	477	5	0	1.49		
	3	537	456	6	1	1.48	1.47 \pm 0.03	0.009
1	1	780	213	6	1	1.23		
	2	790	203	7	0	1.22		
	3	770	227	3	0	1.23	1.23 \pm 0.01	<0.001
2	1	739	259	2	0	1.26		
	2	692	303	3	2	1.31		

	3	724	273	3	0	1.28	1.28 ± 0.03	<0.001
Hg								
0.05	1	446	542	8	4	1.63		
	2	473	516	10	1	1.57		
	3	455	528	15	2	1.54	1.58 ± 0.05	0.746
0.5	1	398	588	11	3	1.56		
	2	455	534	6	5	1.62		
	3	504	479	13	4	1.56	1.58 ± 0.03	0.687
5	1	504	479	13	4	1.51		
	2	509	477	11	3	1.50		
	3	496	499	3	2	1.51	1.51 ± 0.01	0.006
20	1	678	317	5	0	1.33		
	2	637	355	8	0	1.37		
	3	736	261	4	0	1.27	1.32 ± 0.05	0.003
50	1-3	all cultures failed						
MeHg								
0.05	1	314	663	18	5	1.71		
	2	455	535	8	2	1.55		
	3	389	603	6	2	1.62	1.63 ± 0.08	0.191
0.5	1	416	575	9	0	1.59		
	2	434	555	9	2	1.58		
	3	413	581	4	2	1.59	1.59 ± 0.01	0.197
2	1	834	164	2	0	1.18		
	2	795	203	2	0	1.21		
	3	823	173	3	1	1.18	1.19 ± 0.02	<0.001
5	1-3	all cultures failed						

^{a, b} Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the CBPI per treatment with the respective control (^a), and between DMSO and distilled water control (^b).

Table 3.2: Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts treated *in vitro* with MMC, Hg and MeHg.

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	replicate	Number of MN per BN					Total MNCs	mean \pm SD	P value ^a
		cell							
		0	1	2	3	4			
H ₂ O									
1%	1	988	9	2	0	0	11		
	2	994	3	3	0	0	6		
	3	993	7	0	0	0	7	8.0 \pm 2.7	---
DMSO									
1%	1	991	8	1	0	0	9		
	2	992	8	0	0	0	8		
	3	995	3	2	0	0	5	7.3 \pm 2.1	0.733 ^b
MMC									
0.1	1	985	15	0	0	0	15		
	2	984	12	2	1	0	15		
	3	984	13	2	1	1	17	15.6 \pm 1.0	0.010
1	1	948	46	6	0	0	52		
	2	946	47	6	1	0	54		
	3	951	43	5	1	0	49	49.1 \pm 6.1	<0.001
2	1	953	39	7	1	0	48		
	2	954	42	4	0	0	46		
	3	957	39	2	0	2	43	45.1 \pm 2.1	<0.001
Hg									
0.05	1	995	5	0	0	0	5		

	2	995	4	1	0	0	5		
	3	994	5	0	1	0	6	5.2 ± 0.7	0.163
0.5	1	984	16	0	0	0	16		
	2	988	12	0	0	0	12		
	3	987	11	0	2	0	13	13.5 ± 2.1	0.049
5	1	981	15	4	0	0	19		
	2	980	16	4	0	0	20		
	3	972	24	4	0	0	28	22.2 ± 4.8	0.011
20	1	973	24	3	1	0	28		
	2	972	24	3	0	0	28		
	3	964	31	2	3	0	36	28.6 ± 6.7	0.008
50	1-3	all cultures failed							
MeHg									
0.05	1	986	12	2	0	0	14		
	2	984	14	2	0	0	16		
	3	982	17	1	0	0	18	15.8 ± 1.9	0.006
0.5	1	983	14	2	0	1	17		
	2	983	15	0	1	0	16		
	3	978	17	2	1	2	22	18.6 ± 3.2	0.007
2	1	973	21	4	2	0	27		
	2	970	28	2	0	0	30		
	3	977	18	4	1	0	23	26.7 ± 3.2	0.001
5	1-3	all cultures failed							

^{a, b} Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the total number of micronucleated cells observed per 1000 BN cells for each treatment with the respective control (^a), and between DMSO and distilled water control (^b).

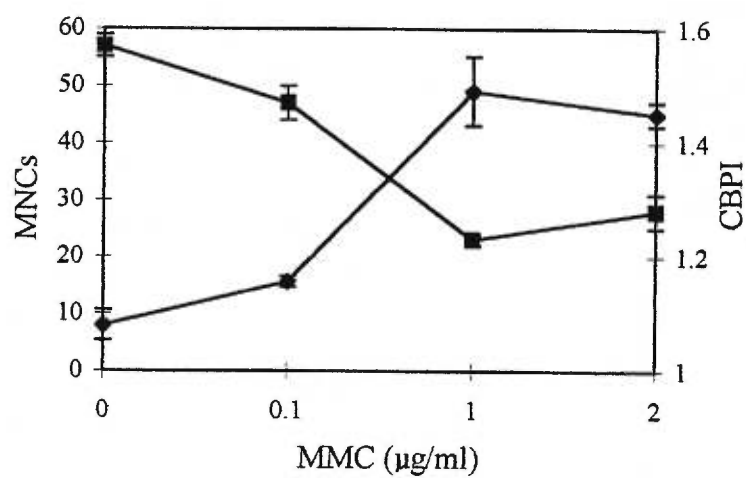


Figure 3.2: Effect of 0.1, 1 and 2 µg/ml MMC on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts. MNC frequency per 1000 BN cells (◆), mean CBPI (■).

Beluga skin fibroblasts treated with Hg and MeHg showed highly significant dose-response increases in micronucleated cells ($y = 10.4 + 1.0x$, $R^2 \text{ adj.} = 64.9\%$, $p \leq 0.001$ for Hg, and $y = 12.2 + 7.59x$, $R^2 \text{ adj.} = 68.5\%$, $p \leq 0.001$ for MeHg), with concomitant highly significant decreases in cell proliferation ($y = 1.56 - 0.0114x$, $R^2 \text{ adj.} = 78.4\%$, $p \leq 0.001$ for Hg, and $y = 1.62 - 0.203x$, $R^2 \text{ adj.} = 84.3\%$, $p \leq 0.001$ for MeHg) (Figures. 3.3 and 3.4). However MMC was generally more potent in inducing these effects, as the regression coefficient (slope) for micronucleated cell frequency was 2.5- and 19-fold greater for MMC than for MeHg and Hg, respectively, and regression coefficients for CBPI were 10.1 and 17.8 times greater respectively for MMC and MeHg than for Hg. Contrary to MMC cultures, frequency of micronucleated cells in mercury treated cultures did not reach a threshold but continued to increase up to the last tested concentration that did not induce total mortality. According to concentrations tested in this study, the CBPI statistically decreased starting at $5 \mu\text{g/ml}$ Hg and $2 \mu\text{g/ml}$ MeHg (Table 3.1). This corresponds to a 12% and 44% mean decrease in BN cell frequency at 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg, respectively, and to a 64% mean decrease in BN cell frequency at 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg, compared to control cultures (Table 3.1). Total mortality (absence of cells on slide) was observed at concentrations of 50 $\mu\text{g/ml}$ Hg and 5 $\mu\text{g/ml}$ MeHg (Table 3.1). However, treatment with 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg resulted in notable cytotoxicity, as approximately 40% of cells, which had not detached from the slide, had a rounded appearance with different degrees of cell deterioration grossly consisting of vacuolized cytoplasm and reduction of nuclei and cell size. Statistically significant increases in micronucleated cell frequency were observed for both compounds at all concentrations when compared to control cultures, with the exception of 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Hg

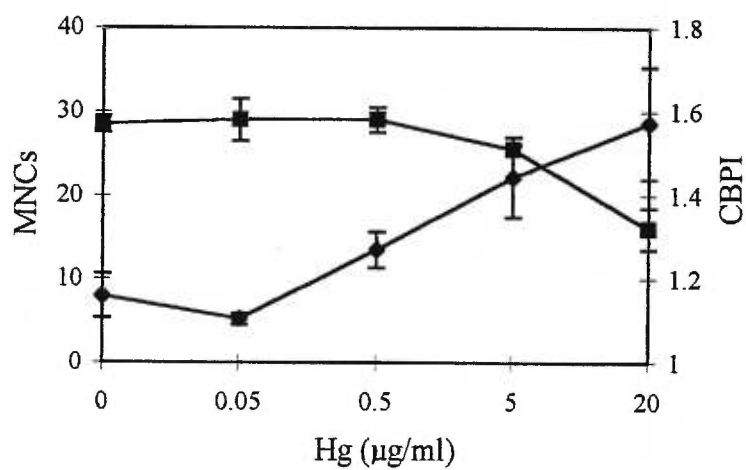


Figure 3.3: Effect of 0.05, 0.5, 5 and 20 µg/ml Hg on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts. MNC frequency per 1000 BN cells (◆), mean CBPI (■).

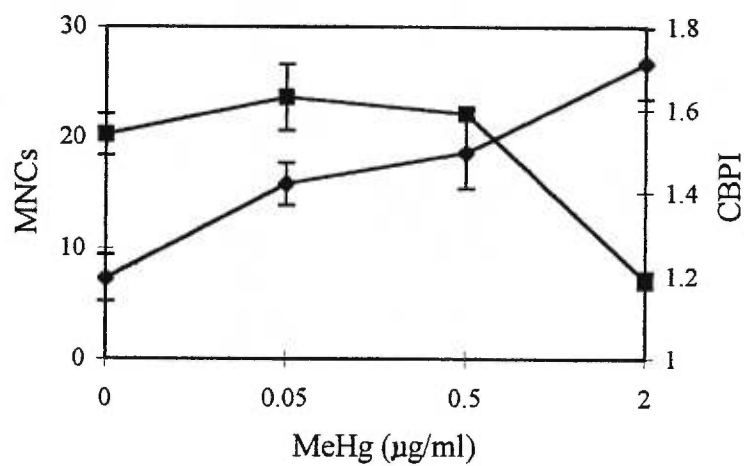


Figure 3.4: Effect of 0.05, 0.5 and 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts. MNC frequency per 1000 BN cells (\blacklozenge), mean CBPI (\blacksquare).

(Table 3.2). A highly significant increase in micronucleated cells was observed at 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg. Concentrations of 0.5, 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg respectively induced 1.7-, 2.8- and 3.6-fold mean increases in micronucleated cells as compared to control. Treatment with MeHg was more potent in inducing MN than Hg, as the regression coefficient was 7.6 times higher and similar micronucleated cell frequencies were observed for 0.05 $\mu\text{g/ml}$ MeHg and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Hg, and for 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg and 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg (Table 3.2)

Cells with two MN were observed both in control and treated cultures, but frequencies were consistently greater across replicates at higher concentrations, such as 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg and 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg (Table 3.2). Multi-micronucleated cells (3 to 4 MN/cell) were never observed in control cultures and rarely found in mercury treated cultures. However, multi-micronucleated cells were mainly found at concentrations which significantly increased micronucleated cell frequency. Similar results for cells with two or more MN were obtained with MMC.

DISCUSSION

This study is part of a long term project on possible mechanisms of action of environmental contaminants in the etiology of disease in the St. Lawrence beluga whale population. Approximately 37% of tumours reported worldwide in cetaceans have been observed in this highly contaminated population (Martineau et al., 1994). Chromosome breakage and aneuploidy is an indication of exposure to genotoxic compounds which may increase the risk of cancer, teratogenesis and genetic disease (Oshimura and Barrett, 1986; Tucker and Preston, 1996). Tumour induction by environmental contaminants may be partly

responsible for the high cancer rate observed in the St. Lawrence beluga whale population (Martineau et al., 1994; DeGuise et al., 1995). Although environmental contaminants exist in mixtures, it is important to first characterize the genotoxic hazard of individual compounds in beluga whale cells. In the present study, the MN assay was successfully used to test the *in vitro* genotoxic effects of mercury compounds in beluga whale skin fibroblasts.

Most cancers are of epithelial origin, including those observed in St. Lawrence beluga whales (Cairns, 1975; Martineau et al., in press). However, epithelial cells of target organs are difficult or impossible to obtain in a non-invasive manner, especially in wild cetaceans. Peripheral blood lymphocytes are considered the best non-invasive source of cells to analyze DNA damage because they circulate throughout all organs and tissues and thus provide an estimate of average whole body exposure to mutagens (Tucker and Preston, 1996). However, blood lymphocytes were not available in sufficient amounts from beluga whales for *in vitro* MN studies. Fibroblasts are the major cell type of conjunctive tissue of organs and body tissues, and are thus omnipresent in the organism (Barlovatz-Meimon and Martelly, 1988). Fibroblasts have been widely used in genotoxicity testing studies using the MN assay and other cytogenetic endpoints. Mice injected i.p. with MeHg *in vivo* have shown increases in chromosome aberrations in skin fibroblasts (Gilbert et al., 1983). Beluga whale fibroblast cell cultures were easily established from a small skin biopsy and cells proliferated vigorously in culture. Therefore, these cells were found to be practical for the analysis of genotoxic effects of environmental contaminants in this species.

Spontaneous MN frequency in beluga skin fibroblasts (5 to 11‰) were in the lower range reported for human skin fibroblasts (3 to 22%) taken from healthy, karyotypically

normal individuals and cultured for 3 to 14 passages (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992). MMC is a direct alkylating agent commonly used as a positive control in the MN assay because it is well recognized as a clastogen and may also act as an aneugen (Rudd et al., 1991). Induction of MN by MMC in beluga fibroblasts was similar or lower to that reported for Chinese hamster fibroblasts (4-fold increase at 0.1 $\mu\text{g/ml}$) and human skin fibroblasts (6- to 8-fold increase at 1 $\mu\text{g/ml}$ and 9-fold increase at 2 $\mu\text{g/ml}$) (Wakata et al., 1987; Rudd et al., 1988, 1991).

Although MMC was a more potent inducer of micronucleated cells, highly significant dose-response increases were obtained with both mercury compounds, indicating apparent strong genotoxicity capacity of these compounds in beluga whale fibroblasts *in vitro*. Mercury compounds may induce DNA single-strand breakage, and more importantly particularly for MeHg, c-mitosis induced aneuploidy through binding to sulfhydryl groups of tubulin proteins of the mitotic apparatus (DeFlora et al., 1994). Reduction of cell proliferation and cytotoxicity induced by mercury compounds may be due to inhibition of protein synthesis and interactions with microtubules, membranes and organelles (Cantoni and Costa, 1983; Miura and Imura, 1987). It is difficult to compare sensitivity of fibroblasts of only a single beluga whale to genotoxic and cytotoxic effects of mercury compounds with cells of other mammals because methodologies and endpoints vary between studies. Impairment of cell division and survival have been reported for similar concentrations of Hg and MeHg in different mammalian cell types (Cantoni and Costa, 1983; Betti et al., 1992; Ogura et al., 1996). DNA strand breakage has been reported in dolphin lymphocytes exposed to 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg (Betti and Nigro, 1996). Sensitivity of beluga whale

fibroblasts to genotoxic activity of Hg and MeHg appears to be greater than that of Chinese hamsters fibroblasts and human lymphocytes cultured using a similar protocol as this study and treated with mercury compounds for 20 to 24 h, as no increase in MN and chromosome aberration frequency was found when these cells were exposed to concentrations ranging from 0.27 to 3 $\mu\text{g/ml}$ Hg and 0.3 to 1.25 $\mu\text{g/ml}$ MeHg, and 2- to 3-fold increases were induced at concentrations ranging from 2.7 to 15 $\mu\text{g/ml}$ Hg and 1.5 to 4.5 $\mu\text{g/ml}$ MeHg (Betti et al., 1992; Yamada et al., 1993; Ogura et al., 1996). These comparisons must be interpreted with caution since only a limited number of studies were found which used similar methodologies as this study. No threshold in MN induction was observed for concentrations of Hg and MeHg tested in this study. This is similar to results from other studies that have tested similar concentrations of MeHg in human lymphocytes (Betti et al., 1992; Ogura et al., 1996). BN beluga fibroblasts containing 2 to 4 MN were mainly observed for the highest tested mercury concentrations (5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg and 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg). Increased number of chromosome aberrations per cell have also been reported for similar concentrations of MeHg in human lymphocytes (Betti et al., 1992).

Low concentrations of Hg (0.5 $\mu\text{g/ml}$) and MeHg (0.05 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$) induced significant increases in MN frequency with no accompanying decrease of cell proliferation in beluga whale fibroblasts. Mercury has not been analyzed in blood or skin of beluga whales. Mean total mercury concentrations on a wet weight basis in liver of St. Lawrence beluga whales is 34 $\mu\text{g/g}$ (range= 0.4 to 202 $\mu\text{g/g}$), compared to 6.6 $\mu\text{g/g}$ (range= 0.02 to 25 $\mu\text{g/g}$) in western Hudson Bay Arctic beluga whales (Wagemann et al., 1990). According to total mercury concentrations on a wet weight basis in liver (63 $\mu\text{g/g}$, range= 0.2 to 218 $\mu\text{g/g}$),

blood ($0.4 \mu\text{g/g}$, range= 0.008 to $1.5 \mu\text{g/g}$) and skin ($1.9 \mu\text{g/g}$, range= 0.002 to $6.1 \mu\text{g/g}$) of spotted dolphins (*Stenella attenuata*) of the Pacific Ocean (André et al., 1990), it is estimated that concentrations on a ppm basis in blood and skin of certain St. Lawrence beluga whales are within the range of concentrations on a ppm basis which resulted in significant DNA damage in fibroblasts. Although *in vitro* effects of mercury compounds are expected to be greater than *in vivo* effects (DeFlora et al., 1994), significant correlations have been found between MN or chromosome aberration frequency and blood mercury concentrations ranging from 0.01 to $1.1 \mu\text{g/g}$ wet weight in humans (Skerfving et al., 1974; Franchi et al., 1994).

In vitro induction of MN by mercury compounds in beluga whale fibroblasts does not signify that these compounds are involved in the etiology of cancer in St. Lawrence beluga whales. However, because MeHg is considered a carcinogen in experimental animals and possibly carcinogenic to humans (IARC, 1993), it can not be excluded as a possible participant in the carcinogenesis process in St. Lawrence beluga whales exposed to high concentrations of this compound. It can be argued that MeHg has yet to be established as a potent carcinogen in fish-eating human populations, but its carcinogenic potential on cetaceans is unknown and there may be differential inter-specific sensitivity to the carcinogenic potential of MeHg. Moreover, there may be additive or synergistic effects of mercury and other environmental pollutants in these highly contaminated whales.

Sources of mercury in the habitat of St. Lawrence beluga whales are principally anthropogenic, mainly attributed to past discharges from a chloroalkali-plant (Gobeil and Cossa, 1993). Fish constitute the major source of contaminants for beluga whales in the St.

Lawrence (Dalcourt et al., 1992; Hickie et al., 1992). MeHg is the predominant form of mercury found in fish (Thompson, 1990). Although a fraction of MeHg is converted to Hg in blood (IARC, 1993), almost all mercury in blood of mammals, including striped dolphins, exists as MeHg (Itano et al., 1984; Vahter et al., 1994). Although beluga whales are predominately exposed to MeHg, both inorganic and organic mercury are genotoxic (DeFlora et al., 1994). However, induction of MN by Hg was an order of magnitude less than MeHg. This is consistent with greater genotoxic potential of MeHg compared to Hg shown in several other *in vitro* studies (DeFlora et al., 1994).

In conclusion, significant increases in MN frequency were found at low concentrations of MeHg that are believed to be comparable to concentrations present in blood and skin of certain St. Lawrence beluga whales. However, the ecotoxicological relevance of these findings is unknown due to the higher sensitivity of *in vitro* systems compared to *in vivo* systems and lack of established association between genotoxicity and carcinogenicity of mercury compounds. Data are needed on exposure and tissue distribution of both inorganic and methylated forms of mercury in arctic and St. Lawrence beluga whales to enable further interpretation of these data. Further studies are in progress to analyze the genotoxic potential of other suspected or known genotoxic environmental compounds and mixtures in beluga whale fibroblasts and lymphocytes using different genotoxic endpoints. This will enable investigations of possible synergistic, additive and/or antagonistic genotoxic effects of environmental mixtures found in St. Lawrence beluga whales. Future MN studies will include techniques using an anti-kinetochore antibody which discriminates between MN containing chromosome fragments and whole chromosomes (Hennig et al., 1988; Bonatti

et al., 1992), to elucidate the mechanisms of MN formation in beluga fibroblasts

ACKNOWLEDGEMENT

We would especially like to thank the Arviat Inuvialuit hunters and Sylvain DeGuise for collection of the beluga whale skin biopsy. We thank Darrell J. Tomkins, Émilien Pelletier and Nicole Lemieux for helpful advice and suggestions on the manuscript. This work was funded by the Fonds pour la Formation de Chercheuses et Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Québec, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) and the Programme d'aide à la recherche de l'Université du Québec à Montréal. Graduate support for J. M. Gauthier was supplied by an FCAR Ph.D. scholarship and the U.S. EPA.

CHAPITRE 4

ARTICLE II

INDUCTION DE MICRONOYAUX PAR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES FIBROBLASTES DE PEAU ISOLÉS DE BÉLUGA

**"Micronuclei induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in isolated beluga
whale fibroblasts"**

**sous press dans: Cell and Molecular Biology of Marine Mammals. C. Pfeiffer
(éditeur). Krieger Publishing Co.**

J. M. Gauthier*, H. Dubeau, and E. Rassart

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C. P. 8888,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

*To whom correspondance should be addressed. E-mail: c2656@er.uqam.ca.

ABSTRACT

Beluga whales inhabiting the St. Lawrence estuary are highly contaminated with environmental pollutants and benzo[*a*]pyrene (BP)-DNA adducts have been found in their tissues. Necropsies of these whales have shown a high incidence of cancer. Tumor induction by environmental contaminants may be partly responsible for the high cancer incidence observed in this population. DNA damage plays an important role in the development of cancer. The micronuclei (MN) assay was used to evaluate the genotoxic potential of BP and

a mixture of five polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH-M) containing BP in primary skin fibroblasts of an Arctic beluga whale. Both BP and the PAH-M induced a highly significant ($p > 0.001$) dose-response increase in micronucleated cells (MNCs). Statistically significant increases in MNCs were found for 0.5, 2 and 5 $\mu\text{g/ml}$ BP and 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M when compared to control cultures. Concentrations of 0.5, 2 and 5 $\mu\text{g/ml}$ BP respectively induced a 2.2-, 2.7- and 5.5-fold mean increase in MNCs. Treatment with BP alone was more potent in inducing MN than the PAH-M, suggesting less than additive or antagonistic effects of PAH compounds in this mixture. Although results of this *in vitro* study do not imply that PAH compounds are involved in the etiology of cancer in St. Lawrence beluga whales, concentrations of 0.5 and 2 $\mu\text{g/ml}$ BP and 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M that induced genotoxic effects in beluga fibroblasts are within the range of concentrations of PAH combustion products found in sediments of certain regions of the habitat of these whales.

Keywords

Beluga whale, St. Lawrence estuary, polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[*a*]pyrene, micronuclei, skin fibroblasts.

INTRODUCTION

The St. Lawrence beluga whales form a small endangered population (Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada-COSEWIC) that inhabits the St. Lawrence estuary and the Saguenay Fjord (Michaud et al., 1993). Both these regions are contaminated

with environmental pollutants, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which principally originate from atmospheric deposition and local aluminium refineries (Martel et al., 1986; Dalcourt et al., 1992; Gearing et al., 1994). Necropsies of dead stranded whales have shown a high prevalence of tumors, non-neoplastic lesions, and opportunistic diseases (DeGuise et al., 1994, 1995; Martineau et al., 1994). Cancer has been diagnosed as the principal cause of death in 18% of 97 examined carcasses and the annual crude cancer rate was estimated to be 233/100 000; higher than in most human and domestic animal populations (Martineau et al., in press; Martineau, pers. comm.). High concentrations of polychlorinated biphenyls, organochlorine compounds, and mercury and the presence of benzo[*a*]pyrene (BP)-DNA adducts have been found in tissues of the St. Lawrence beluga whales (Muir et al., 1990, 1996; Martineau et al., 1994). On the contrary, Arctic beluga whales have low concentrations of environmental contaminants and no BP-DNA adducts have been detected in their tissues (Muir et al., 1990; Martineau et al., 1994). Moreover, no gross evidence of cancer has been found in approximately 50 Arctic beluga whale carcasses sampled for routine biological purposes (D. J. St. Aubin, unpubl). Factors such as tumor induction, tumor promotion, and immunosuppression induced by environmental contaminants have been proposed to explain the elevated cancer incidence in the St. Lawrence population (DeGuise et al., 1994, 1995).

DNA damage plays an important role in the development of cancer (Evans, 1990; Tucker and Preston, 1996). Many of the multi-ringed (>3 rings) PAH compounds are potent mutagens and are considered carcinogenic in experimental animals and possible carcinogens in humans (IARC, 1983, 1987). Environmental mixtures containing PAH compounds, such

as those resulting from aluminium production, are also considered carcinogenic (IARC, 1987). PAHs are metabolically activated to highly reactive DNA-binding electrophiles responsible for tumor induction and other toxic effects of these compounds (Pelkonen and Nebert, 1982; Harvey, 1991; Nesnow et al., 1995). BP is a model PAH compound which has been widely used as an index of PAH contamination and as a positive control in *in vitro* and *in vivo* genotoxicity studies.

The mammalian cytokinesis-block micronuclei (MN) assay is a well known cytogenetic technique used to assess DNA damage induced by environmental contaminants (Fenech, 1993). MN are chromosomal fragments or whole chromosomes that are not incorporated into daughter nuclei during mitosis because of chromosomal breakage or dysfunction of the mitotic apparatus, respectively (Fenech, 1993). Cytochalasin-B prevents cytokinesis and produces binucleated (BN) cells which can be easily and accurately scored for MN following one cell cycle (Fenech and Morley, 1985).

Very few studies exist on the genotoxic effects of environmental contaminants in marine mammals. Recently, induction of single-strand breakage and micronuclei by methylmercury has been demonstrated *in vitro* in lymphocytes of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and skin fibroblasts of beluga whales, respectively (Betti and Nigro, 1996; Gauthier et al., in press). To our knowledge, this is the first study to test for genotoxic effects of PAHs in marine mammals cells. In this study, primary skin fibroblasts of an Arctic beluga whale were used to test the sensitivity of these cells to the genotoxic hazard of BP and a PAH mixture (PAH-M) containing BP at concentrations relevant to those found in sediments of the St. Lawrence beluga whale habitat.

METHODS

Cell culture

Primary beluga whale fibroblasts were isolated from a skin biopsy sample taken by S. DeGuise from a subadult or adult (3.9 m) male Arctic beluga whale collected by subsistence Inuvialuit hunting at Arviat, west Hudson Bay, Canada. The biopsy skin sample was placed in fetal calf serum (FCS) (Gibco) containing 10% dimethyl-sulphoxide (DMSO) in a cryopreservation vial and stored in liquid nitrogen until use. The skin sample was thawed, placed in a 60 mm plastic Petri dish, rinsed several times in phosphate buffered saline (PBS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco), sliced into small pieces with a scalpel and rinsed again. The sample was then transferred to an Erlenmeyer flask and dispersed twice for 20 minutes with a magnetic stirrer at 37°C in PBS containing 0.125% trypsin and 1.33 mM EDTA (Gibco). Following each of the two trypsinisations, the cell suspension was pipetted into a centrifuge tube and FCS was added to arrest treatment. The pooled cell suspensions were centrifuged at 1900 rpm for 20 minutes and the cell pellet resuspended in modified Eagle's medium supplemented with penicillin-streptomycin and 15% FCS in a 60 mm Petri dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Media was replenished after 24 hours and cells were maintained thereafter by changing the media every 1-2 days. The same serum batch was used during the whole course of the study.

Preparation of the PAH mixture

All PAH compounds were obtained from UltraScientific. Constituents of the PAH-M were selected for their prevalence in sediments of areas of the St. Lawrence estuary with

high beluga frequentation and/or their known genotoxic and carcinogenic activities (IARC, 1987; Harvey, 1991; Dalcourt et al., 1992; Michaud et al., 1993). The PAH-M constitutes about 50% of the mixture of 16 PAHs identified in sediments in these areas (Dalcourt et al., 1992). The PAH-M was prepared according to proportions found in these sediments and is composed of 17% BP, 10% benzo[*a*]anthracene (BA), 10% dibenzo[*a,h*]anthracene (DBA), 42% benzo[*b*]fluoranthrene (BF), and 21% chrysene.

Treatment and slide preparation

Experiments were performed using pooled exponentially growing cells at passages 7 to 10. Confluent cultures were trypsinized and cells were seeded at 5×10^5 cells/ml on sterilized microscopic slides placed individually in 100 mm Petri dishes and incubated for 48 hours. BP and constituents of the PAH-M were dissolved in DMSO. DMSO was used as the negative control. BP was used as the positive control and as a test compound along with the PAH-M. Final DMSO concentration was 1% for all cultures. The exogenous metabolic system (S9 mix) was prepared with 10% S9 liver fraction from Arochlor treated rats (Microbiological Associates), according to Maron and Ames (1984). Cells were treated (3 replicates per culture) with BP or the PAH-M with S9 mix (5% v/v) in fresh media containing 2.5% FCS for 3 hours, at concentrations shown in Tables 4.1 and 4.2. Range of experimental doses were chosen according to those found in sediments of the St. Lawrence estuary and Saguenay Fjord and according to preliminary MN induction experiments. Media was then aspirated and replaced by fresh media containing 15% FCS and 6 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin-B (Sigma) and cells incubated another 48 hours. Cells were fixed *in situ* once

with half PBS and half methanol:acetic acid (4:1) and twice with methanol:acetic acid (4:1), air dried, and stained with 10% Giemsa (Sigma) for 30 min.

MN Analysis

MN were scored according to established criteria (Countryman and Heddle, 1976; Heddle et al., 1978), with the following specifications: 1) cells were scored only if there was intact cytoplasm, a distinct nuclear membrane, and little or no debris and overlap with adjacent cells, and 2) MN were scored only if their texture and focal plane was similar to that of main nuclei and if there was absence of a bridge between the MN and main nuclei. However, MN which overlapped the boundaries of the main nuclei were scored (Fenech, 1993), if the complete membranes of both objects could be readily distinguished by transparency. The cytokinesis-blocked proliferation index, which measures the average number of cell cycles per cell, were calculated for each treatment as $CBPI = 1(M1) + 2(M2) + 3(M3+M4) / N$, where M1 to M4 represent the number of cells with 1 to 4 nuclei and N is the total number of cells scored (Surrallés et al., 1995). For each treatment, at least 1000 binucleated (BN) cells were scored for MN at 400X magnification and presence of MN was confirmed at 1000X magnification.

Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare CBPI and frequency of micronucleated BN cells (MNCs) for each treatment with the control. Regression analysis was performed to test for dose-response relationships for each test compound,

where the Y axis represents either the CBPI or frequency of micronucleated BN cells and the X axis represents the concentration of the compound. All statistical analyses were conducted using Minitab (Minitab software Inc., release 8, State College, PA).

RESULTS

Typical BN cells with and without a MN are shown in Figure 3.1. *In situ* culture and fixation of fibroblasts resulted in cells with very well preserved cytoplasm. CBPI and MNC frequency in DMSO control cultures of beluga whale skin fibroblasts ranged from 1.48 to 1.54 and 7 to 12 % BN cells, respectively (Tables 4.1 and 4.2).

Results for CBPI and MN induction in beluga whale skin fibroblasts treated *in vitro* with BP and the PAH-M are respectively shown in Tables 4.1 and 4.2. Beluga skin fibroblasts treated with BP and the PAH-M showed highly significant dose-response increases in MNCs ($y = 11.7 + 7.45x$, R^2 adjusted = 92.5%, $p < 0.001$ for BP, and $y = 14.1 + 2.04x$, R^2 adj. = 88.5%, $p < 0.001$ for the PAH-M), with concomitant highly significant decreases in cell proliferation ($y = 1.47 - 0.056x$, R^2 adj. = 87.9%, $p < 0.001$ for BP, and $y = 1.45 - 0.016x$, R^2 adj. = 71.5%, $p < 0.001$ for the PAH-M) (Figures 4.1 and 4.2). Frequency of MNCs in cultures treated with BP and the PAH-M did not reach a plateau but continued to increase up to the last tested concentration. According to concentrations tested in this study, the CBPI statistically decreased starting at 2 $\mu\text{g/ml}$ BP and 5 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M (Table 4.1). Decreases in CBPI correspond respectively to a 29% and 61% mean decrease in BN cell frequency at 2 and 5 $\mu\text{g/ml}$ BP, and to a 53% and 64% mean decrease in BN cell frequency at 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M, compared to control cultures (Table 4.1). No

Table 4.1: Distribution of cells with different number of nuclei per 1000 cells and CBPI values for beluga whale skin fibroblasts after *in vitro* treatment with BP and a PAH-M in presence of S9 mix

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Replicate	Cells with indicated number of nuclei				CBPI	Mean \pm SD	P value ^a
		1	2	3	4			
		DMSO						
1%	1	531	462	7	0	1.48		
	2	472	520	5	3	1.54		
	3	535	453	9	3	1.48	1.50 \pm 0.03	---
BP 0.02	1	540	451	7	2	1.47		
	2	585	412	3	0	1.42		
	3	561	433	5	1	1.45	1.45 \pm 0.03	0.097
0.5	1	522	469	8	1	1.49		
	2	612	379	6	3	1.40		
	3	610	384	5	1	1.40	1.43 \pm 0.05	0.124
2	1	667	329	4	0	1.34		
	2	604	389	6	1	1.40		
	3	700	297	3	0	1.30	1.35 \pm 0.05	0.012
5	1	833	163	3	1	1.17		
	2	769	228	3	0	1.23		
	3	824	173	3	0	1.18	1.19 \pm 0.03	<0.001
PAH-M 0.02	1	556	437	6	1	1.45		

	2	525	468	6	1	1.48		
	3	534	463	3	0	1.47	1.47±0.02	0.202
0.1	1	512	477	8	3	1.50		
	2	511	484	4	1	1.49		
	3	528	465	7	0	1.48	1.49±0.01	0.656
5	1	783	213	3	1	1.22		
	2	756	239	5	0	1.25		
	3	777	220	3	0	1.23	1.23±0.02	<0.001
20	1	840	157	3	0	1.16		
	2	804	193	2	1	1.19		
	3	830	167	3	0	1.17	1.17±0.15	<0.001

^a: Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the CBPI per treatment with the respective control.

Table 4.2: Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts after *in vitro* treatment with BP and the PAH-M in presence of S9 mix

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Replicate	Number of MN per BN cell					Total MNCs	Mean \pm SD	P value ^a
		0	1	2	3	4			
		DMSO							
1%	1	988	10	2	0	0	12	9.0 \pm 2.6	---
	2	993	5	2	0	0	7		
	3	992	5	2	1	0	8		
BP 0.02	1	990	9	1	0	0	10	11.7 \pm 1.5	0.205
	2	98	9	3	0	0	12		
	3	987	9	4	0	0	13		
0.5	1	979	20	1	0	0	21	20.0 \pm 1.2	0.007
	2	978	19	1	1	1	22		
	3	983	14	3	0	0	17		
2	1	975	22	2	1	0	25	24.3 \pm 1.2	0.001
	2	977	22	0	1	0	23		
	3	975	22	2	1	0	25		
5	1	945	44	9	1	1	55	49.3 \pm 6.7	0.001
	2	949	35	11	3	2	51		
	3	958	35	6	1	0	42		
PAH-M									
0.02	1	988	11	1	0	0	12		
	2	985	13	2	0	0	15		

	3	984	14	2	0	0	16	14.3±2.1	0.052
0.1	1	982	15	1	1	1	18		
	2	988	10	2	0	0	12		
	3	986	11	2	1	0	14	14.7±3.1	0.072
5	1	972	23	4	1	0	28		
	2	970	23	5	2	0	30		
	3	967	27	5	0	1	33	30.3±2.5	0.001
20	1	942	40	15	3	1	58		
	2	958	31	8	3	0	42		
	3	940	41	15	1	3	60	53.3±9.9	0.002

^a: Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the total number of micronucleated cells observed per 1000 BN cells for each treatment with the respective control.

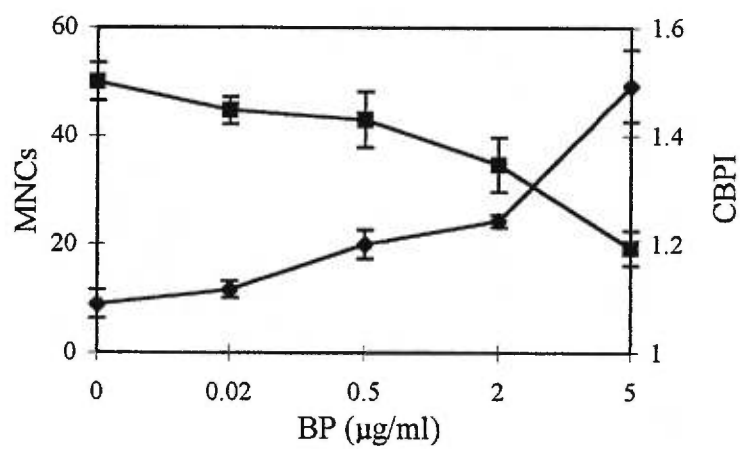


Figure 4.1: Effect of 0.02, 0.5, 2 and 5 $\mu\text{g/ml}$ BP on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts. Mean MNC frequency (◆), mean CBPI (■).

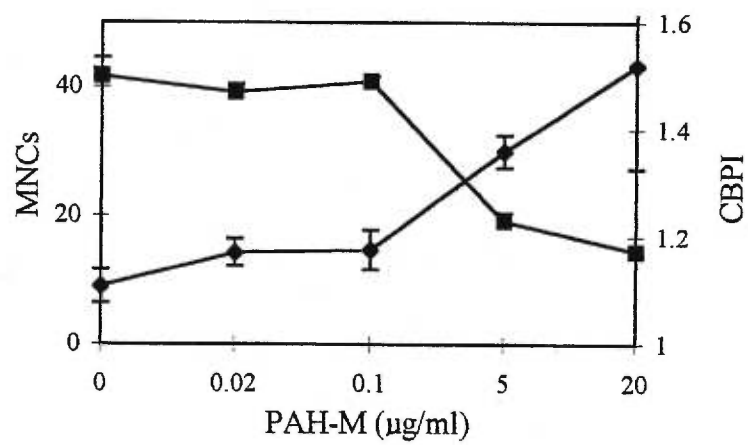


Figure 4.2: Effect of 0.02, 0.1, 5 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M on MN induction and cell proliferation in beluga whale fibroblasts. Mean MNC frequency (◆), mean CBPI (■).

statistical increase in MNC frequency was observed for 0.02 $\mu\text{g/ml}$ BP and 0.02 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M. Statistically significant increases in MNC frequency were observed starting at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ BP and 5 $\mu\text{g/ml}$ of the PAH-M (Table 4.2). A highly significant increase in MNCs was observed at 2 and 5 $\mu\text{g/ml}$ BP. Concentrations of 0.5, 2, and 5 $\mu\text{g/ml}$ BP respectively induced 2.2-, 2.7-, and 5.5-fold mean increases in MNCs as compared to DMSO control (Table 4.2). Treatment with BP alone appeared to be more potent in inducing MN than the PAH-M, as the regression coefficient was 3.7 times higher, and MNC frequencies were statistically higher at 5 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0.01$). Cells containing 2-4 MN were observed both in control and treated cultures, but particularly at concentrations which significantly increased the total MNC frequency (Table 4.2).

DISCUSSION

This study is part of a long term project on possible mechanisms of action of environmental contaminants in the etiology of disease in the St. Lawrence beluga whale population. Approximately 37% of tumors reported worldwide in cetaceans have been observed in this highly contaminated population (Martineau et al., 1994). Chromosome breakage is an indication of exposure to genotoxic compounds which may increase the risk of cancer (Evans, 1990; Tucker and Preston, 1996). It has been proposed that tumor induction by PAHs may be partly responsible for the high cancer incidence observed in the St. Lawrence beluga whale population (DeGuise et al., 1994, 1995; Martineau et al., in press).

Most cancers are of epithelial origin, including those observed in St. Lawrence

beluga whales (Cairns, 1975; Martineau et al., in press). However, epithelial cells of target organs are difficult or impossible to obtain in a non-invasive manner, especially in wild cetaceans. Peripheral blood lymphocytes are considered the best non-invasive source of cells to analyze DNA damage because they circulate throughout all organs and tissues and thus provide an estimate of average whole body exposure to mutagens (Tucker and Preston, 1996). However, blood lymphocytes were not available in sufficient amounts from beluga whales for *in vitro* MN studies. Fibroblasts are the major cell type of conjunctive tissue of organs and body tissues, and are thus omnipresent in the organism (Barlovatz-Meimon and Martelly, 1988). Fibroblasts have been widely used in genotoxicity testing studies using the MN assay and other cytogenetic endpoints.

Beluga whale fibroblast cell cultures were easily established from a small skin biopsy and cells proliferated vigorously in culture. Consequently, these cells were found to be very practical for the analysis of genotoxic effects of environmental contaminants in this species. Spontaneous MN frequency in beluga skin fibroblasts (7-12‰) were within the lower range reported for human skin fibroblasts (3-22‰) taken from healthy, karyotypically normal individuals and cultured for 3 to 14 passages (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992).

Highly significant dose-response increases in MNCs were obtained with both BP and the PAH-M, indicating apparent potent genotoxicity of these compounds in beluga whale fibroblasts. Metabolism of PAH compounds generates DNA-binding electrophilic metabolites and reactive oxygen species which can result in MN formation and impairment of cell division (Kim et al., 1995; Vienneau et al., 1995). It is difficult to compare sensitivity of fibroblasts of only a single beluga whale to genotoxic and cytotoxic effects of

PAH compounds with cells of other mammals since methodologies and endpoints vary between studies. Impairment of cell division has been reported for similar concentrations of BP in human lymphocytes and Chinese hamster fibroblasts (Ellard et al., 1991; Vian et al., 1993; Warshawsky et al., 1995). Sensitivity of beluga whale fibroblasts to the genotoxic effects of BP treatment in the presence of S9 mix appears to be similar to Chinese hamster fibroblasts (Ellard et al., 1991), lower than rat skin primary fibroblasts which showed a 4.5-fold increase in MN frequency at 0.25 $\mu\text{g/ml}$ BP (Vienneau et al., 1995), and greater than human blood lymphocytes which showed no increase in MN frequency at 1.6 $\mu\text{g/ml}$ BP and a 2.6-fold increase at 3.9 $\mu\text{g/ml}$ BP (Vian et al., 1993). No plateau in MN induction was observed for BP concentrations tested in this study. This is similar to results from other studies that have tested similar concentrations of BP in human lymphocytes and Chinese hamster fibroblasts (Ellard et al., 1991; Vian et al., 1993; Warshawsky et al., 1995). These comparisons must be interpreted with caution since only a limited number of studies were found which used similar methodologies as in this study.

Although BP is often used as a model PAH compound in genotoxicity studies, it may not adequately predict the genotoxicity of a PAH mixture since interactions between PAH compounds may modify the genotoxicity of the mixture. Interactions between compounds of PAH mixtures can be synergistic, additive or antagonistic (Haugen and Peak, 1983; Springer et al., 1989; Culp and Beland, 1994; Nesnow et al., 1995). Although individual compounds of the PAH-M other than BP, such as BA, DBA, BF, and chrysene, have also been found to induce DNA adducts and MN in mammalian cells, potency of induction varies widely between these compounds (He and Baker, 1991; Crofton-Sleigh et al., 1993; Ross

et al., 1995). The apparent lower MN inducing potency of the PAH-M compared to BP alone in beluga whale fibroblasts suggests less than additive or antagonistic effects of PAH compounds in the mixture. Most studies have shown that mixtures of various PAHs, including those used in this study, are less potent in inducing DNA adduct formation, mutations, and micronuclei than BP alone and this is probably due to competitive inhibition of metabolic pathways involved in formation of reactive metabolites (Haugen and Peak, 1983; Springer et al., 1989; Reddy et al., 1991).

BP-DNA adducts have been found in tissues of the St. Lawrence beluga whales (Martineau et al., 1994). Analysis of stomach contents have shown that bottom invertebrates constitute an important proportion of the diet of St. Lawrence beluga whales (Vladykov, 1946). Beluga whales can undergo prolonged dives to the seabed at depths up to 350 m to forage (Martin et Smith, 1992). Field observations suggests that St. Lawrence beluga whales dig in bottom sediments to obtain their prey (Michaud R., pers. comm.). PAHs have been identified as the most likely contaminants causing positive genotoxicity results in bottom sediment samples (e.g., Marvin et al., 1993; Gagné et al., 1995; Papoulias and Buckler, 1996). These findings suggests that St. Lawrence beluga whales are exposed to sediment-bound PAHs and to the genotoxic effects of these compounds. Concentrations of Σ PAH (sum of 13-16 unsubstituted PAHs of pyrogenic origin) in sediments of areas of the St. Lawrence estuary and the Saguenay Fjord frequented by the beluga whales range between 0.07-10 and 0.5-30 $\mu\text{g/g}$ (dry weight), respectively (Martel et al., 1986; Dalcourt et al., 1992; Gearing et al., 1994). Concentrations of 0.5 and 2 $\mu\text{g/ml}$ BP that induced genotoxic effects in beluga fibroblasts are within the range of PAH concentrations found in surface sediments

of the St. Lawrence estuary and the Saguenay Fjord. However, genotoxic effects of the PAH-M were observed only at 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ which corresponds to concentrations of PAHs found in surface sediments of the more contaminated regions of these regions. *In vitro* induction of MN by PAH compounds in beluga whale fibroblasts does not signify that these compounds are involved in the etiology of cancer in St. Lawrence beluga whales. However, because PAHs are considered potent mutagens and carcinogens in experimental animals and possibly carcinogenic to humans (IARC, 1983, 1987), these compounds can not be excluded as possible participants in the carcinogenesis process in St. Lawrence beluga whales. Concentrations between 0.1 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the PAH-M should be tested in order to define the lower limit of MN induction by this mixture in these cells.

The ecotoxicological consequences of these findings are unknown and real effects are probably more complex since only five PAHs were used to represent the PAH mixture present in the St. Lawrence beluga whale habitat. Moreover, although PAHs are readily absorbed in tissues of the organism, not all ingested PAHs will be converted to DNA adducts among which some will be removed by DNA repair enzymes (Celotti et al., 1993; Vienneau et al., 1995). However, exposure to PAHs throughout the long lifespan of beluga whales (~30 years) may result in accumulation of DNA lesions and increased risk of mutation fixation and cancer initiation (Poirier et al., 1992). Although *in vitro* effects of PAHs are expected to be greater than *in vivo* effects, significant correlations have been found between exposure to environmental PAH pollution and chromosome aberration frequency in human blood lymphocytes (Perera et al., 1992).

In conclusion, significant increases in MN frequency in beluga whale fibroblasts

were found at concentrations of BP and of a quintary mixture of PAHs that are within the range of concentrations present in sediments of the St. Lawrence beluga whale habitat. However, the ecotoxicological relevance of these findings is unknown and real effects are certainly more complex due to interactions between environmental contaminants, detoxification of PAHs, repair of DNA adducts and to the higher sensitivity of *in vitro* systems compared to *in vivo* systems. Further studies are in progress to analyze the genotoxic potential of other environmental compounds and of more complex mixtures in beluga whale fibroblasts and lymphocytes using different genotoxic endpoints. This will enable further investigations of possible synergistic, additive or antagonistic genotoxic effects of environmental mixtures found in St. Lawrence beluga whales. Future MN studies will include techniques using an anti-kinetochore antibody which discriminates between MN containing chromosome fragments and whole chromosomes (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992), to elucidate the mechanisms of MN formation in beluga fibroblasts.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would especially like to thank S. DeGuise for collection of the beluga whale skin biopsy. This work was funded by the Fonds pour la Formation de Chercheuses et Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Québec, the US Environmental Protection Agency (EPA), and the Programme d'aide à la recherche de l'Université du Québec à Montréal. Graduate support for J. M. Gauthier was supplied by an FCAR Ph.D. scholarship and the EPA.

CHAPITRE 5

ARTICLE III

INDUCTION DE MICRONOYAUX PAR DES COMPOSÉS ORGANOCHLORÉS IN VITRO DANS LES FIBROBLASTES DE PEAU DE BÉLUGA

"Induction of micronuclei by organochlorine compounds in vitro in beluga whale
skin fibroblasts"

sous press dans: **Mutation Research**

J. M. Gauthier*, H. Dubeau, and E. Rassart

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C. P. 8888,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

*To whom correspondance should be addressed. E-mail: c2656@er.uqam.ca.

ABSTRACT

Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) inhabiting the St. Lawrence estuary are highly contaminated with environmental pollutants and have a high incidence of cancer. Environmental contaminants may be partly responsible for the high cancer incidence observed in this population. DNA damage plays an important role in the development of cancer. The micronuclei (MN) assay was used to test the genotoxic potential of organochlorine (OC) pesticides with and without external metabolic factor in skin fibroblasts of an Arctic beluga whale. Toxaphene, chlordane and p,p'-DDT induced significant ($p < 0.05$) dose-response increases of micronucleated cells. Statistically

significant increases in micronucleated cells, ranging from 1.7- to 5-fold when compared to control cultures, were observed for 0.05, 0.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene, 2, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ chlordane and 10 and 15 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT. Presence of exogenous metabolic factor (S9) completely abolished the MN induction potency of chlordane and p,p'-DDT, and toxaphene induced MN formation at higher concentrations (0.5 $\mu\text{g/ml}$) than without S9 mix. The ecotoxicological significance of MN induction by low concentrations of toxaphene is unknown and do not imply that toxaphene is involved in the etiology of cancer in St. Lawrence beluga whales. However, because of the known genotoxicity of toxaphene and the long lifespan of beluga whales, it can not be excluded that toxaphene may pose a long-term genetic hazard to the more contaminated whales of this population.

Keywords

Beluga whale, St. Lawrence estuary, organochlorine pesticides, micronuclei, skin fibroblasts.

INTRODUCTION

The St. Lawrence estuary beluga whales (*Delphinapterus leucas*) form a small, isolated and endangered population (Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada-COSEWIC) which has been the object of several toxicological and pathological studies during the past 10 years (Béland et al., 1993; Martineau et al., 1994). Necropsies of dead stranded whales have shown a high prevalence of tumours, non-neoplastic lesions and opportunistic diseases (DeGuise et al., 1995; Martineau et al., 1994). Cancer has been

diagnosed as the principal cause of death in 18% of about 100 examined carcasses and the annual crude cancer rate was estimated to be 233/100 000; higher than in most human and domestic animal populations (Martineau et al., in press; Martineau, pers. comm.). Most malignant cancers found in St. Lawrence beluga whales are adenocarcinomas of the small intestine, but adenocarcinomas of other organs and other types of cancers have also been observed in the ovaries, bladder, liver, stomach and salivary and mammary glands (DeGuise et al., 1994; Martineau et al., 1995). High concentrations of environmental contaminants, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine (OC) pesticides and mercury, and presence of benzo[*a*]pyrene DNA adducts have been found in tissues of St. Lawrence beluga whales (Martineau et al., 1987; Muir et al., 1990, 1996; Wagemann et al., 1990; Martineau et al., 1994). DDT, toxaphene and chlordane compounds are the major OC pesticides found in this population (Muir et al., 1996). On the contrary, Arctic beluga whales have low concentrations of environmental contaminants and no gross evidence of cancer has been found in approximately 50 carcasses sampled for routine biological purposes (Muir et al., 1990; Wagemann et al., 1990; D. J. St. Aubin, pers. comm.). Factors such as tumour induction, tumour promotion and immunosuppression induced by environmental contaminants have been proposed to explain the elevated cancer incidence in the St. Lawrence population (Martineau et al., 1994; DeGuise et al., 1995).

DNA damage plays an important role in the development of cancer (Oshimura and Barrett, 1986; Tucker & Preston, 1996). DDT, toxaphene, and to a lesser extent chlordane, are considered carcinogenic in experimental animals (IARC, 1987). Toxaphene is a complex mixture of several chlorinated congeners and it is known to be mutagenic (Ashby

and Tennant, 1991). Although contradictory results have been obtained on the genotoxicity of chlordane and p,p'-DDT compounds, these compounds have been shown to induce DNA damage at the chromosome level *in vitro* and *in vivo* in human and animal cell systems (Palmer et al., 1972; Grant, 1973; Larsen and Jalal, 1974; Lessa et al., 1976; Sobti et al., 1983; Sakar et al., 1993).

Very few studies exist on the genotoxic effects of environmental contaminants in marine mammals. Recently, induction of single-strand breakage and micronuclei by methylmercury has been demonstrated *in vitro* in lymphocytes of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and skin fibroblasts of beluga whales, respectively (Betti and Nigro, 1996; Gauthier et al., in press). To our knowledge, this is the first study to test the putative genotoxic effects of OC compounds in marine mammals cells. In this study, primary skin fibroblasts of an Arctic beluga whale were used to test the sensitivity of these cells to the genotoxic hazard of toxaphene, chlordane and p,p'-DDT.

METHODS

Cell culture

Primary beluga whale fibroblasts were isolated from a skin biopsy sample taken by S. DeGuise from a subadult or adult (3.9 m) male Arctic beluga whale collected by subsistence Inuvialuit hunting at Arviat, west Hudson Bay, Canada. The cells were isolated with trypsin and cultured in modified Eagle's medium supplemented with penicillin-streptomycin and 15% FCS at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ as previously described (Gauthier et al., in press).

Treatment and slide preparation

Experiments were performed using pooled exponentially growing cells at passages 7 to 10. Confluent cultures were trypsinized and cells were seeded at 5×10^5 cells/ml on sterilized microscopic slides placed individually in 100 mm Petri dishes and incubated for 48 hours. MMC (Sigma) was dissolved in distilled water and BP (Sigma) and OC pesticides (toxaphene, chlordane, p,p'-DDT) (Ultra-Scientific) were dissolved in DMSO. Distilled water was used as the negative control for MMC and DMSO as the negative control for BP and OC pesticides. Final concentrations of distilled water and DMSO were 1% for all cultures. BP and MMC were used as the positive controls for cultures treated with and without an exogenous metabolic system, respectively. The exogenous metabolic factor (S9 mix) was prepared with 10% S9 liver fraction from Arochlor treated rats (Microbiological Associates), according to Maron and Ames (1984). Cells were treated (3 replicates per culture) with OC pesticides with or without S9 mix (5% v/v) in fresh medium containing 2.5% FCS for 3 hours, at concentrations shown in Tables 1 and 2. The ranges of experimental concentrations were chosen according to those found in St. Lawrence beluga whales and according to preliminary cell-killing dose-response experiments. Medium was then aspirated and replaced by fresh medium containing 15% FCS and 6 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin-B (Sigma) and cells incubated another 48 hours. Cells were fixed *in situ* once with half PBS and half methanol:acetic acid (4:1) and twice with methanol:acetic acid (4:1), air dried, and stained with 10% Giemsa (Sigma) for 30 min.

MN Analysis

MN were scored according to established criteria (Countryman and Heddle, 1976; Fenech, 1993), with previously described specifications (Gauthier et al., in press). MN were not scored using blinded or coded slides, but slides were analysed randomly. The cytokinesis-blocked proliferation index, which measures the average number of cell cycles per cell, were calculated for each treatment as $CBPI = 1(M1) + 2(M2) + 3(M3+M4) / N$, where M1 to M4 represent the number of cells with 1 to 4 nuclei and N is the total number of cells scored (Surrallés et al., 1995). For each treatment, at least 1000 binucleated (BN) cells were scored for MN at 400X magnification and presence of MN was confirmed at 1000X magnification.

Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare CBPI and frequency of micronucleated BN cells (MNCs) for each treatment with the control, between control cultures and in toxaphene cultures treated with and without exogenous metabolic factor. Regression analysis was performed to test for dose-response relationships for each test compound, where the Y axis represents either the CBPI or frequency of MNCs and the X axis represents the concentration of the compound. All statistical analyses were conducted using Minitab (Minitab software, release 8, State College, PA, USA).

RESULTS

Typical BN cells with and without a MN are shown in Figure 3.1. Tables 5.1 to 5.4 summarize the results for MN induction and CBPI in beluga whale skin fibroblasts treated

Table 5.1: Distribution of cells with different numbers of nuclei per 1000 cells and CBPI values for beluga whale skin fibroblasts after *in vitro* treatment with MMC, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT.

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	replicate	Cells with indicated number of nuclei				CBPI	Mean \pm SD	P value ^a
		1	2	3	4			
		H ₂ O						
1%	1	457	533	8	2	1.55		--
	2	423	563	12	2	1.59		
	3	437	554	7	2	1.57	1.57 \pm 0.02	
DMSO								
1%	1	451	530	11	8	1.57		0.404 ^b
	2	530	456	8	6	1.48		
	3	456	531	10	3	1.57	1.54 \pm 0.05	
MMC								
0.1	1	578	418	4	0	1.43		0.009
	2	518	477	5	0	1.49		
	3	537	456	6	1	1.48	1.47 \pm 0.03	
1	1	780	213	6	1	1.23		<0.001
	2	790	203	7	0	1.22		
	3	770	227	3	0	1.23	1.23 \pm 0.01	
2	1	739	259	2	0	1.26		<0.001
	2	692	303	3	2	1.31		
	3	724	273	3	0	1.28	1.28 \pm 0.03	
Toxaphene								
0.05	1	592	402	4	2	1.41		
	2	557	435	6	2	1.45		

	3	506	488	6	0	1.50	1.45±0.05	0.095
0.5	1	553	441	5	1	1.45		
	2	564	432	4	0	1.44		
	3	571	422	6	1	1.44	1.44±0.01	0.033
5	1	662	325	10	3	1.35		
	2	639	348	9	4	1.37		
	3	631	356	9	4	1.38	1.37±0.02	0.005
10	1	743	254	3	0	1.26		
	2	770	227	3	0	1.23		
	3	737	258	5	0	1.26	1.25±0.02	0.001
Chlordane								
2	1	663	333	4	0	1.34		
	2	671	324	5	0	1.33		
	3	618	378	3	1	1.39	1.35±0.03	0.006
5	1	660	337	3	0	1.34		
	2	673	325	2	0	1.33		
	3	658	338	3	0	1.39	1.35±0.03	0.006
10	1	762	233	5	0	1.24		
	2	845	154	1	0	1.17		
	3	785	213	2	0	1.22	1.21±0.04	0.001
p,p'-DDT								
5	1	517	475	6	2	1.49		
	2	526	467	6	1	1.48		
	3	559	434	6	1	1.45	1.47±0.02	0.108
10	1	896	104	0	0	1.10		
	2	836	162	2	0	1.17		
	3	820	178	2	0	1.18	1.15±0.04	0.001
15	1	863	137	0	0	1.14		
	2	909	91	0	0	1.09		

3	899	101	1	0	1.10	1.11±0.03	<0.001
---	-----	-----	---	---	------	-----------	--------

^{a, b}: Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the CBPI per treatment with the respective control (^a), and between DMSO and distilled water control (^b).

Table 5.2: Distribution of cells with different numbers of nuclei per 1000 cells and CBPI values for beluga whale skin fibroblasts after *in vitro* treatment with BP, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT in the presence of S9 mix.

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	replicate	Cells with indicated number of nuclei				CBPI	Mean \pm SD	P value ^a	
		1	2	3	4				
		DMSO							
1%	1	531	462	7	0	1.48			
	2	472	520	5	3	1.54			
	3	535	453	9	3	1.48	1.50 \pm 0.03	---	
BP									
	0.5	1	522	469	8	1	1.49		
		2	612	379	6	3	1.40		
3		610	384	5	1	1.40	1.43 \pm 0.05	0.124	
2	1	667	329	4	0	1.34			
	2	604	389	6	1	1.40			
	3	700	297	3	0	1.30	1.35 \pm 0.05	0.012	
5	1	833	163	3	1	1.17			
	2	769	228	3	0	1.23			
	3	824	173	3	0	1.18	1.19 \pm 0.03	<0.001	
Toxaphene									
0.05	1	558	439	2	1	1.44			
	2	547	448	5	0	1.46			
	3	554	440	6	0	1.45	1.45 \pm 0.01	0.074	
0.5	1	596	401	3	0	1.41			
	2	538	457	3	2	1.47			
	3	514	483	2	1	1.49	1.46 \pm 0.04	0.238	
5	1	530	462	7	1	1.48			

	2	514	478	6	2	1.49		
	3	569	425	5	1	1.44	1.47±0.03	0.299
10	1	530	463	5	2	1.48		
	2	550	444	5	1	1.46		
	3	570	428	2	0	1.43	1.46±0.03	0.154
Chlordane								
2	1	515	478	7	0	1.49		
	2	533	462	5	0	1.47		
	3	522	474	3	1	1.48	1.48±0.01	0.391
5	1	548	448	3	1	1.46		
	2	627	372	1	0	1.37		
	3	591	405	4	0	1.41	1.41±0.05	0.058
10	1	558	438	4	0	1.45		
	2	566	430	3	1	1.44		
	3	628	371	1	0	1.37	1.42±0.04	0.068
p,p'-DDT								
5	1	509	478	8	5	1.50		
	2	620	378	3	0	1.38		
	3	613	384	3	0	1.39	1.42±0.07	0.152
10	1	535	462	3	0	1.47		
	2	541	451	5	3	1.47		
	3	548	447	5	0	1.46	1.47±0.01	0.176
15	1	685	310	4	1	1.32		
	2	684	314	2	0	1.31		
	3	630	367	3	0	1.37	1.33±0.03	0.004

^a: Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the CBPI per treatment with the respective control.

Table 5.3: Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts after *in vitro* treatment with MMC, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT.

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	replicate	Number of MN per BN cell					Total MNCs	Mean \pm SD	P value ^a
		0	1	2	3	4			
		H ₂ O							
1%	1	988	9	2	0	0	11		
	2	994	3	3	0	0	6		
	3	993	7	0	0	0	7	8.0 \pm 2.7	---
DMSO									
1%	1	991	8	1	0	0	9		
	2	992	8	0	0	0	8		
	3	995	3	2	0	0	5	7.3 \pm 2.1	0.733 ^b
MMC									
0.1	1	985	15	0	0	0	15		
	2	984	13	2	1	0	15		
	3	984	13	2	1	1	17	15.6 \pm 1.0	0.010
1	1	948	46	6	0	0	52		
	2	946	47	6	1	0	54		
	3	951	43	5	1	0	49	49.1 \pm 6.1	<0.001
2	1	953	39	7	1	0	48		
	2	954	42	4	0	0	46		
	3	957	39	2	0	2	43	45.1 \pm 2.1	<0.001
Toxaphene									
0.05	1	986	14	2	0	0	16		
	2	988	12	2	0	0	14		
	3	982	11	3	3	1	18	16.0 \pm 2.0	0.007
0.5	1	973	20	5	2	0	27		

	2	976	17	5	2	0	24		
	3	980	16	1	2	1	20	23.7±3.5	0.002
5	1	976	22	2	0	0	24		
	2	977	20	2	0	1	23		
	3	978	20	2	0	0	22	23.0±1.0	<0.001
10	1	966	29	2	2	0	33		
	2	965	27	5	2	1	35		
	3	965	30	5	0	0	35	34.3±1.2	<0.001
Chlordane									
2	1	991	8	1	0	0	9		
	2	991	6	1	1	1	9		
	3	991	8	1	0	0	9	9.0±0.0	0.238
5	1	973	23	3	1	0	27		
	2	980	18	2	0	0	20		
	3	981	16	1	2	0	19	22.0±4.4	0.006
10	1	984	10	4	1	1	16		
	2	977	13	6	3	1	23		
	3	980	13	6	1	0	20	19.7±3.5	0.006
p,p'-DDT									
5	1	988	9	0	2	0	11		
	2	987	9	4	0	0	13		
	3	988	8	1	1	0	10	11.3±1.5	0.055
10	1	978	15	4	3	0	22		
	2	978	16	4	1	1	22		
	3	968	22	6	4	0	32	25.3±5.8	0.007
15	1	965	19	10	4	2	35		
	2	962	29	7	2	0	38		
	3	963	25	8	1	3	37	36.7±1.5	<0.001

^{a,b}: Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the total number of MNCs

observed per 1000 BN cells for each treatment with the respective control (^a), and between DMSO and distilled water control (^b).

Table 5.4: Distribution of MN and total number of MNCs per 1000 BN beluga whale skin fibroblasts after *in vitro* treatment with MMC, toxaphene, chlordane and p,p'-DDT in the presence of S9 mix.

Chemical / concentration ($\mu\text{g/ml}$)	replicate	Number of MN per BN cell					Total MNCs	Mean \pm SD	P value ^a
		0	1	2	3	4			
		DMSO							
1%	1	988	10	2	0	0	12	9.0 \pm 2.6	---
	2	993	5	2	0	0	7		
	3	992	5	2	1	0	8		
0.5	1	979	20	1	0	0	21	20.0 \pm 1.2	0.007
	2	978	19	1	1	1	22		
	3	983	14	3	0	0	17		
2	1	975	22	2	1	0	25	24.3 \pm 1.2	0.001
	2	977	22	0	1	0	23		
	3	975	22	2	1	0	25		
5	1	945	44	9	1	1	55	49.3 \pm 6.7	0.001
	2	949	35	11	3	2	51		
	3	958	35	6	1	0	42		
Toxaphene									
0.05	1	988	8	4	0	0	12	12.7 \pm 0.6	0.079
	2	987	11	0	2	0	13		
	3	987	8	5	0	0	13		
0.5	1	980	13	5	1	1	20	21.7 \pm 3.8	0.009
	2	973	17	4	2	3	26		
	3	981	17	1	1	0	19		
5	1	986	13	1	0	0	14		

	2	985	11	3	1	0	15		
	3	983	14	3	0	0	17	15.3±1.5	0.023
10	1	990	6	3	1	1	10		
	2	985	13	1	1	0	15		
	3	986	12	2	0	0	14	13.0±2.6	0.138
Chlordane									
2	1	982	17	1	0	0	18		
	2	990	7	1	1	1	10		
	3	989	7	4	0	0	11	13.0±4.4	0.246
5	1	984	14	0	2	0	16		
	2	987	10	3	0	0	13		
	3	991	8	1	0	0	9	12.7±3.5	0.222
10	1	989	7	3	1	0	11		
	2	990	8	1	1	0	10		
	3	986	10	2	2	0	14	11.7±2.1	0.242
p,p'-DDT									
5	1	990	8	2	0	0	10		
	2	991	6	2	1	0	9		
	3	988	8	2	1	1	12	10.3±1.5	0.492
10	1	995	3	1	1	0	5		
	2	992	4	3	1	0	8		
	3	990	9	0	1	0	10	7.7±2.5	0.561
15	1	988	10	2	0	0	12		
	2	989	8	3	0	0	11		
	3	990	8	0	1	1	10	11.0±1.0	0.288

^a. Probability values are based on a one-way ANOVA comparing the total number of MNCs observed per 1000 BN cells for each treatment with the respective control.

in vitro with toxaphene, chlordane and p,p'-DDT in absence or presence of S9 mix, respectively. MN frequencies and CBPI were similar for all 3 negative control cultures ($p=0.155$ and 0.458 , respectively). A significant increase in MNC frequency was found for all 3 tested concentrations of positive controls BP and MMC, used respectively with and without the presence of S9 mix (Table 5.2 and 5.4). MMC and BP treatment caused concentration-response increases in MNCs ($y=16.1 + 18.9x$, R^2 adjusted= 66.8%, $p < 0.001$ for MMC, and $y=11.7 + 7.45x$, R^2 adj.= 92.5%, $p < 0.001$ for BP), which was accompanied by a concentration-dependant decrease in CBPI ($y=1.46 - 0.115x$, R^2 adj.= 59.9%, $p = 0.002$ for MMC and $y=1.47 + 0.056x$, R^2 adj.= 87.9%, $p < 0.001$ for BP).

Beluga skin fibroblasts treated with OC pesticides toxaphene, chlordane and p,p'-DDT without S9 mix showed significant concentration-response increases in MNCs ($y= 14.9 + 1.91x$, R_2 adj.= 64.6% and $p < 0.001$ for toxaphene, $y= 9.97 + 1.20x$, R_2 adj.= 46.8% and $p = 0.08$ for chlordane, and $y= 6.90 + 1.88x$, R_2 adj.= 88.2% and $p < 0.001$ for p,p'-DDT), with concomitant decreases in CBPI ($y= 1.48 + 0.0235x$, R_2 adj.= 82.3% and $p < 0.001$ for toxaphene, $y= 1.47 + 0.026x$, R_2 adj.= 79.4% and $p < 0.001$ for chlordane, and $y= 1.54 + 0.031x$, R_2 adj.= 84.5% and $p < 0.001$ for p,p'-DDT).

According to concentrations tested in this study in the absence of S9 mix, CBPI statistically decreased starting at $0.5 \mu\text{g/ml}$ toxaphene, $2 \mu\text{g/ml}$ chlordane and $10 \mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT (Table 5.2). This corresponds to a 15%, 32% and 51% decrease in BN cells at 0.5, 5 and $10 \mu\text{g/ml}$ toxaphene, to a 32%, 34% and 60% decrease for 2, 5 and $10 \mu\text{g/ml}$ chlordane, and to a 71% and 78% decrease for 10 and $15 \mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT, respectively.

All OC pesticides induced genotoxic effects in beluga whale fibroblasts without an

external metabolic factor within the concentration range used in this study. However, MMC was more potent in inducing MN, as the regression coefficient (slope) was about 10- to 16-folds greater than for OC pesticides. Toxaphene induced statistically significant increases in MNCs at all tested concentrations (Table 5.1). Concentrations of 0.05, 0.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene respectively induced 1.7-, 2.4-, 2.4 and 3.6-fold mean increases in MNCs as compared to control. Treatments with chlordane and p,p'-DDT induced MN at higher concentrations than toxaphene. Concentrations of 2 $\mu\text{g/ml}$ chlordane and 5 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT did not induce an increase in MNCs. However, statistically significant increases were observed for 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ chlordane and 10 and 15 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT. Similar results were observed for 0.5 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene and 5 $\mu\text{g/ml}$ chlordane and 10 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT ($p=0.695$), and for 10 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene and 15 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT ($p=0.102$) (Table 2). Contrary to MMC, toxaphene and chlordane cultures, frequency of MNCs in p,p'-DDT treated cultures did not reach a threshold and continued to increase up to the last tested concentration.

The presence of S9 mix greatly reduced or abolished the genotoxic effects of OC pesticides in beluga whale fibroblasts. No significant relationships between MNC frequency or CBPI and concentration were observed for any of the tested OC pesticides in the presence of S9 mix. CBPI was not affected by any of the OC compounds in the presence of S9 mix, with the exception of 15 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT, which significantly reduced the CBPI (Table 5.3). The MN induction potency of chlordane and p,p'-DDT was completely eliminated in the presence of exogenous metabolic factor at concentrations tested in this study (Table 5.4). All tested concentrations of toxaphene were more potent in inducing MN without S9 mix than in the presence of this metabolic factor ($p<0.001$ to $p=0.05$), with the exception of the

0.5 $\mu\text{g/ml}$ treatment which induced similar MNC frequencies in both test systems ($p=0.539$) (Table 5.4). Moreover, MNC frequency was found to decrease from 0.5 to 10 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene.

DISCUSSION

This study is part of a long term project on possible mechanisms of action of environmental contaminants in the etiology of disease in the St. Lawrence beluga whale population. Approximately 37% of tumours reported worldwide in cetaceans have been observed in this highly contaminated population (Martineau et al., 1994). Chromosome breakage and aneuploidy is an indication of exposure to genotoxic compounds which may increase the risk of cancer (Oshimura and Barrett, 1986; Tucker and Preston, 1996). Tumour induction by environmental contaminants may be partly responsible for the high cancer incidence observed in the St. Lawrence beluga whale population (Martineau et al., 1994; DeGuise et al., 1995). Although environmental contaminants exist in mixtures, it is important to first characterize the genotoxic hazard of individual compounds in beluga whale cells. In the present study, the genotoxic potential of the predominant organic compounds found in St. Lawrence beluga whales were evaluated *in vitro* with the MN assay in beluga whale fibroblasts.

Most cancers are of epithelial origin, including those observed in St. Lawrence beluga whales (Cairns, 1975; Martineau et al., in press). However, epithelial cells of target organs are difficult or impossible to obtain in a non-invasive manner, especially in wild cetaceans. Peripheral blood lymphocytes are considered the best non-invasive source of

cells to analyze DNA damage because they circulate throughout all organs and tissues and thus provide an estimate of average whole body exposure to mutagens (Tucker and Preston, 1996). However, blood lymphocytes were not available in sufficient amounts from beluga whales for *in vitro* MN studies. Fibroblasts are the major cell type of conjunctive tissue of organs and body tissues, and are thus omnipresent in the organism (Barlovatz-Meimom and Martelly, 1988). Fibroblasts have been widely used in genotoxicity testing studies using the MN assay and other cytogenetic endpoints. Beluga whale fibroblast cell cultures were easily established from a small skin biopsy and cells proliferated vigorously in culture. Therefore, these cells were found to be practical for the analysis of the sensitivity of this species to the genotoxic effects of environmental contaminants.

MN frequency in negative control cultures of beluga skin fibroblasts (5 to 12‰) were in the lower range reported for human skin fibroblasts (3 to 22%) taken from healthy, karyotypically normal individuals and cultured for 3 to 14 passages (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992). Model direct-acting mutagen MMC and indirect-acting mutagen BP have been shown to induce DNA damage at the chromosome level in other mammalian cells at concentrations within the range of those used in this study (Wakata and Sasaki, 1987; Rudd et al., 1991; Ellard et al., 1991; Vian et al., 1993).

Although MMC was a more potent inducer of MNCs, significant concentration-dependent increases were obtained with all OC pesticides, indicating apparent direct genotoxicity of these compounds in beluga whale fibroblasts *in vitro*. Toxaphene is an electrophilic DNA reactive compound and is the only OC compound found in beluga whales that is known to be genotoxic in mammalian cells (Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990;

Ashby and Tennant, 1991). Certain authors have suggested that OCs, such as DDT, hexachlorobenzene and polychlorinated biphenyls, could act as aneugens through inactivation of the mitotic spindle (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Parry et al., 1996; Canonero et al., 1997). Although conflicting data have been reported on the genotoxic potential of p,p'-DDT and chlordane, these compounds have been shown to induce chromosome damage and decreases in cell proliferation *in vitro* in human and animal cells at concentrations within the range of those used in this study (Palmer et al., 1972; Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990). Concentrations ranging from 2 to 20 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene have been shown to induce sister chromatid exchanges (SCEs) and decrease cell proliferation in the absence of S9 mix in cultured human lymphoid cells and Chinese hamster fibroblasts (Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990). Chlordane induced significant increases of SCEs in human lymphoid cells without S9 mix at a concentration of 4 $\mu\text{g/ml}$ (Sobti et al., 1983). Sensitivity of beluga whale fibroblasts to the genotoxic effects of p,p'-DDT treatment in the absence of S9 mix appears to be greater than Chinese hamster fibroblasts which showed no increase in chromosome aberrations at 12 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT, and lower than rat kangaroo cells which showed an 8-fold increase in chromosome aberrations at 10 $\mu\text{g/ml}$ p,p'-DDT (Palmer et al., 1972; Mahr and Miltenburger, 1976). These comparisons must be interpreted with caution since only a limited number of studies were found which used comparable methodologies and endpoints as this study.

The presence of an external metabolic factor greatly reduced or eliminated the effect of OC pesticides on cell proliferation and MN induction in beluga whale fibroblasts, perhaps indicating detoxification by the mixed function oxidases of the rat liver microsomes and/or

interactions with components of the S9 mix (Saleh, 1991; Steinel et al., 1990). Decreases in cell proliferation induced by toxaphene and p,p'-DDT have been attributed to damage of cell membranes, possibly through interactions with membrane lipids due to the lipophilic nature of these compounds (Mahr and Miltenburger, 1976; Byczkowski, 1977; Mourelle et al., 1985; Steinel et al., 1990). Metabolites of OC pesticides are less lipophilic than the parent compounds (Matsumura, 1985), which may explain the reduced effects on cell proliferation of these compounds in presence of S9 mix. Decreases in toxaphene-induced SCE have been reported in human lymphoid cells in the presence of S9 mix (Sobti et al., 1983). Contrary to this study, SCE induction in human lymphoid cells by chlordane was greater in the presence of S9 mix than in non-activated cultures (Sobti et al., 1983). However, addition of S9 mix eliminated the induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) by chlordane in human fibroblasts (Ahmed et al., 1977). These differences may be due to dissimilar sensitivity of these endpoints and/or cell types to chlordane-induced genotoxicity. P,p'-DDT is principally metabolized to intermediate metabolite p,p'-DDE and to final metabolite p,p'-DDA by mixed function oxidases (Matsumura, 1985). Contradictory data have been reported on the differential chromosomal breakage potency of p,p'-DDT compounds (Palmer et al., 1972; Kelly-Garvet and Legator, 1973; Mahr and Miltenburger, 1976). However, for concentrations similar to that used in this study (10 $\mu\text{g/ml}$), p,p'-DDE and p,p'-DDA were shown to be less potent in inducing chromosome aberrations than p,p'-DDT in rat kangaroo cells (Palmer et al., 1972). This may explain the loss of p,p'-DDT-induced MN formation in beluga whale fibroblasts in presence of S9 mix.

The lowest concentrations of toxaphene, chlordane and p,p'-DDT which induced

significant increases in MN without S9 mix were 0.05, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. OC pesticides have not been analyzed in blood of beluga whales. However, approximative concentrations can be estimated by adjusting for differential lipid content of blood and blubber, since OCs in blood and other tissues reach an equilibrium, and that at equilibrium, concentrations in tissues are principally governed by their lipid content (Clark et al., 1987; Boon et al., 1994). Mean blubber lipid content of St. Lawrence beluga whales is about 85% (range=57-96%), which is within the range found in other odontocetes (Tanabe et al., 1981; Boon et al., 1994; Muir et al., 1996). Blood lipid content in odontocetes is about 0.1% (range=0.05-0.32%) (Tanabe et al., 1981; Boon et al., 1994). Concentrations of toxaphene, chlordane and p,p'-DDT in St. Lawrence beluga whales (n=36) range respectively between 2-46, 1-28 and 3-389 $\mu\text{g}/\text{g}$ lipid in blubber (Martineau et al., 1987; Muir et al., 1996), corresponding to approximatively 0.002-0.05, 0.001-0.03 and 0.003-0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight in blood when 0.1% blood lipid content is used. According to these concentrations on a ppm basis, only the effects of 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toxaphene could be within the range of concentrations found in circulating blood of some of these whales. Similar conclusions are reached when blood concentrations are estimated using 0.32% blood lipid content. Nonetheless, toxaphene-induced effects were no longer observed at 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the presence of S9 mix, which may indicate that the *in vivo* genotoxic hazard of this compound is low at concentrations found in St. Lawrence beluga whales. Moreover, *in vivo* effects are expected to be lower than *in vitro* effects. Concentrations between 0.05 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ should be tested to define the lower limit for MN induction in the presence of exogenous metabolic factor in beluga whale fibroblasts.

In conclusion, significant increases in MN frequency were found at low concentrations of toxaphene. However, the ecotoxicological significance of these results is unknown and real effects are certainly more complex due to detoxifying metabolism of toxaphene, higher sensitivity of *in vivo* systems compared with *in vitro* systems and lack of established association between genotoxicity and carcinogenicity of toxaphene. Accordingly, results of this *in vitro* study do not necessarily signify that toxaphene is involved in the etiology of cancer in St. Lawrence beluga whales. Nevertheless, considering the carcinogenicity in experimental animals and established genotoxicity of toxaphene and the long lifespan of beluga whales (~ 30 years), it can not be excluded that toxaphene may pose a long-term genetic hazard to the more contaminated St. Lawrence beluga whales. Data are needed on exposure and tissue distribution of OC pesticides in St. Lawrence beluga whales to enable further interpretation of these data. Further studies are in progress to analyze the genotoxic potential of other suspected or known genotoxic environmental compounds and mixtures in beluga whale fibroblasts and lymphocytes using different genotoxic endpoints. This will enable investigations of possible synergistic, additive and/or antagonistic genotoxic effects of environmental mixtures found in St. Lawrence beluga whales. Future MN studies will include techniques using an anti-kinetochore antibody which discriminates between MN containing chromosome fragments and whole chromosomes (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992), to elucidate the mechanisms of MN formation in beluga fibroblasts.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would especially like to thank S. DeGuise for collection of the beluga whale skin biopsy. We thank Chris D. Metcalfe for suggestions on the manuscript. This work was funded by the Fonds pour la Formation de Chercheuses et Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Québec, the US Environmental Protection Agency (EPA), and the Programme d'aide à la recherche de l'Université du Québec à Montréal. Graduate support for J. M. Gauthier was supplied by an FCAR Ph.D. scholarship and the EPA.

CHAPITRE 6

ARTICLE IV

BIOMARQUEURS DE DOMMAGE CYTOGÉNÉTIQUE CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS

"Biomarkers of cytogenetic damage in marine mammals"

soumis dans: Marine Mammal Science

J. M. Gauthier^{1*}, H. Dubeau¹, E. Rassart¹, W. M. Jarman² and R. S. Wells³

¹Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM),
Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada, ²University of Utah, Department of Civil and
Environmental Engineering, Salt Lake City, Utah, 84108, USA, ³Chicago Zoological
Society, Mote Marine Laboratory, Sarasota, Florida, 34236, USA.

*To whom correspondance should be addressed. Email: c2656@er.UQAM.ca.

ABSTRACT

Certain environmental contaminants found in marine mammals have been shown to cause DNA damage and cancer. The micronuclei (MN), sister chromatid exchange (SCE) and/or chromosome aberration (CA) assays were used to assess DNA damage in blood lymphocytes of individuals of the relatively healthy and lightly contaminated Arctic beluga whale (*Delphinapterus leucas*), Sarasota Bay, FL, bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and Northwestern Atlantic grey (*Halichoerus grypus*) and harp (*Phoca groenlandicus*) seal populations. MN cell (MNC) frequencies ranged between 2 and 14/1000 binucleated (BN)

cells and was statistically similar between species. In bottlenose dolphins, MNC frequency was correlated with age and was significantly higher in females than in males. No intraspecific variation in MNC frequency was found in beluga whales. SCE and total CA frequencies ranged respectively between 1 and 15 SCE(s)/per cell and 8-14 CAs/100 cells in beluga whales. SCE and CA frequencies did not vary with age or sex in beluga whales. The MN, SCE and CA assays were found to be practical tools for the detection of DNA damage in marine mammals and could be used in the future to compare DNA damage between relatively lightly and highly contaminated populations.

Keywords

Micronuclei, sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, beluga whale, bottlenose dolphin, grey seal, harp seal.

INTRODUCTION

Marine mammal populations, such as the St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*), the Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), the US Atlantic coast bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), and Baltic seals, have shown high concentrations of environmental contaminants in their tissues which have been associated with diseases (Kuehl et al., 1991; Aguilar and Borrell, 1994; Martineau et al., 1994; Olsson et al., 1994). Chemical contamination has been suggested to be involved in the high prevalence of cancer in St. Lawrence beluga whales and California Sea lions (*Zalophus californianus*) (DeGuise et al., 1994; Martineau et al., 1995; Gulland et al., 1996).

DNA damage plays an important role in the development of cancer and can be a risk factor for teratogenesis and genetic disease (Oshimura and Barrett, 1986; Evans, 1990; Tucker and Preston, 1996). Certain environmental contaminants found in marine mammals, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and certain organochlorine compounds (OCs) and heavy metals, have been shown to cause DNA damage and cancer (Palmer et al., 1972; Majumbar et al., 1976; IARC, 1983, 1987; Sobti et al., 1983; Wagemann and Muir, 1984; Oshimura and Barrett, 1986; Steinel et al., 1990; Sargent et al., 1989; Hellou et al., 1990; Bhunya and Jena, 1992; Meisner et al., 1992; Perrera et al., 1992; Sarkar et al., 1993; Franchi et al., 1994; Martineau et al., 1994; Olsson et al., 1994; Warshawsky et al., 1995; Canonero et al., 1997; Gauthier et al., in press a, b).

The mammalian cytokinesis-block micronucleus (CBMN), sister chromatid exchange (SCE) and chromosome aberration (CA) assays are well-known cytogenetic techniques used to assess DNA damage at the chromosomal level in human and animal peripheral blood lymphocytes (Carrano and Natarajan, 1988; Fenech, 1993). Peripheral blood lymphocytes are considered the best non-invasive source of cells to analyze DNA damage because they circulate throughout all tissues and organs and thus provide an estimate of average whole body exposure to mutagens (Tucker and Preston, 1996). Micronuclei (MN) are chromosomal fragments or whole chromosomes that are not incorporated into daughter nuclei during mitosis because of chromosomal breakage or dysfunction of the mitotic apparatus, respectively (Fenech, 1993). SCEs are thought to be exchanges of chromosomal fragments between two chromatids of the same chromosome during replication of damaged DNA (Latt, 1981). CAs can be analyzed in cells as structural chromatid- or chromosome-

type aberrations, such as gaps, breaks and deletions within a chromosome or rearrangement within or between chromosomes (Carrano and Natarajan, 1988).

Recently, these assays have been proposed for biomonitoring exposure to genotoxic compounds in the natural habitat of fish and invertebrates, terrestrial mammalian wildlife and seals (DeFlora et al., 1991; AlSabti and Metcalfe, 1995; Hongell, 1996; Zúñiga et al., 1996). Studies have shown statistically higher MN or CA frequencies in fish and invertebrates from marine environments and farm animals from areas with high levels of PAHs and/or OCs and/or heavy metals compared to those sampled from reference sites with low levels of these compounds (Rubeš, 1987; De Flora et al., 1991; Rubeš et al., 1992, 1997; AlSabti and Metcalfe, 1995). Statistically significant correlations have been found between total mercury concentrations in blood and CAs in humans consuming fish and seafood, and between PAH pollution in air and CAs in humans (Skerfving et al., 1974; Perera et al., 1992; Franchi et al., 1994).

Marine mammals are exposed to genotoxic chemicals in the marine environment, but only one study has addressed possible genotoxic activity in wild marine mammal populations (Hongell, 1996). Screening of changes in genotoxic activity inside a population or between different populations requires spontaneous values to be established in populations exposed to relatively low levels of putative genotoxic environmental contamination. Arctic beluga whales and Northwestern Atlantic seals are considered to be healthy populations, have relatively low concentrations of environmental contaminants and no gross evidence of cancer has been found in 50 Arctic beluga whale carcasses sampled for routine biological purposes (Muir et al., 1990; Béland et al., 1992; Addison and Stobo,

1993; Beck et al., 1993; Martineau et al., 1994; D. J. St. Aubin, pers. comm.). Blood samples can easily be obtained from captive beluga whales and seals and biological parameters of these animals are usually well known. Bottlenose dolphins residing in Sarasota Bay, Florida, are considered to represent a healthy population and relatively low concentrations of environmental contaminants have been found in their tissues (Scott et al., 1990; Lahvis et al., 1993; Vedder et al., 1993). Contrary to most wild marine mammal populations, information on biological parameters are available for individual dolphins through long-term monitoring and health assessments conducted on this population since 1970 (Scott et al., 1990).

The objective of this study is to develop biomarkers of genotoxic activity in marine mammals to evaluate possible long term effects, such as cancer and teratogenicity, induced by putative genotoxic environmental contaminants. Analysis of DNA damage and chemical compounds in blood samples of marine mammal populations exposed to low levels of environmental contamination could provide baseline data for monitoring health status of these populations and those of populations exposed to high levels of environmental contamination. This preliminary study presents data on MN in peripheral blood lymphocytes of individual Arctic beluga whales, Sarasota Bay bottlenose dolphins, Northwestern Atlantic grey seals and harp seals (*Phoca groenlandicus*) and SCEs and CAs in Arctic beluga whales. Cell proliferation indices are also presented for each animal. Variations in MN, SCE and CA frequencies and values of proliferation indices are evaluated according to species, sex and age.

METHODS

Culture and slide preparation

Blood samples were taken between 1996 and 1998 from: 1) nine Arctic beluga whales held captive at the Vancouver Aquarium or the J. G. Shedd Aquarium, 2) nine Sarasota Bay, FL, USA, resident free-ranging bottlenose dolphins during the capture-release health assessment program conducted by the Chicago Zoological Society and Mote Marine Laboratory, 3) two sedated wild harp seals at the Magdalan Islands, Québec, Canada, and 4) three grey seals held captive at the Granby Zoo, Granby, Québec, Canada (Table 6.1). Beluga whales and grey seals had been held in captivity for at least 5 years at sampling. All samples were taken in sterile heparinized tubes. Cetacean and grey seal blood samples were shipped on ice within 3 days at l'Université du Québec à Montréal (UQAM) and used immediately on arrival. Harp seal blood samples were kept on ice until frozen within 8h in fetal calf serum (Gibco) containing 10% DMSO in liquid nitrogen vapour, brought back to l'UQAM by airplane, placed in liquid nitrogen and thawed 3 weeks later for use.

All captive animals were in good health at the time of sampling and there was no history of major illness for any of the animals. With the exception of FB128, FB111, FB046 and FB109, free-ranging bottlenose dolphins were considered in good health according to body condition assessment, blood parameter analysis, ultrasound and veterinarian examination at capture. FB128 had elevated white blood cell count, mediastinal masses observed by ultrasound, and a papilloma virus on the prepuce. FB111 also had elevated white blood cell count. FB046 had an abscess below the throat in the gular region caused by a bacterial infection and FB109 had a possible stingray barb embedded in its head. Harp

Table 6.1: Data on life history parameters of beluga whales, bottlenose dolphins, harp and grey seals of this study.

Animal	Sex	Age*	Origin	Institution	Comments
<i>Delphinapterus leucas</i>					
Aurora	F	8	Churchill River	Vancouver	
Immiayuk	F	12	Churchill River	J.G. Shedd	
Puiji	F	12	Churchill River	J.G. Shedd	
Allua	F	13	Churchill River	Vancouver	
Mauyak	F	17	Churchill River	J.G. Shedd	12.5 months gestation
Kavna	F	25	Churchill River	Vancouver	
Imaq	M	8	Churchill River	Vancouver	
Nanuq	M	13	Churchill River	Vancouver	
Inuk	M	17	Churchill River	J.G. Shedd	
<i>Tursiops truncatus</i>					
FB109	F	2	Sarasota Bay	NA	calf of FB079
FB003	F	8	Sarasota Bay	NA	
FB079	F	16	Sarasota Bay	NA	lactating FB109
FB111	F	20	Sarasota Bay	NA	lactating FB144
FB144	M	2	Sarasota Bay	NA	calf of FB111
FB128	M	5	Sarasota Bay	NA	
FB142	M	5	Sarasota Bay	NA	
FB010	M	16	Sarasota Bay	NA	
FB046	M	20	Sarasota Bay	NA	
<i>Phoca groenlandicus</i>					
Pg-1	M	adult	Magdalen Islands	NA	
Pg-2	M	adult	Magdalen Islands	NA	

Haliechoerus grypus

Caroline	F	6	captive born	Granby Zoo
Chloé	F	6	captive born	Granby Zoo
Chinook	M	7	New Brunswick	Granby Zoo

*Age at blood sampling. Age shown in years or by age group.

NA: non applicable.

seals appeared to be in good health at capture. Sex was determined visually for all animals. Ages of grey seals Caroline and Chloé were determined from date of birth in captivity. Age estimations of beluga whales and grey seal Chinook were based on size, coloration and associations at time of capture. Ages of bottlenose dolphins were determined through research activities which have been carried since 1970 (Wells and Scott, 1990). Ages of FB010, FB109, FB128, FB144 and FB003 were determined by visual observations of these animals within a few days or weeks after their births through monitoring of their mothers. FB142 was estimated to be the length of a 5 year old according to age-body length curves (Hohn, 1980). FB111 was first observed with a calf in 1983 and thus was at least 20 years old at sampling because age at sexual maturity is about 6 years old (Wells et al., 1987). FB079 was first caught during the capture-release health assessment program in 1985 at 218 m, which corresponds to 3-5 years of age and had her first calf in 1993 (Hohn, 1980). Taken together with the fact that females give birth to their first calves at 5-12 years of age (Wells et al., 1987), FB079 was about 16 years old in 1997. FB046 was first caught in 1984 at 229 m, which corresponds to about 5-8 years of age and making him about 20 years of age at sampling (Hohn, 1980).

Lymphocytes were isolated from whole blood using the Ficoll-Paque (Gibco) differential centrifugation gradient method. Lymphocytes were cultured for 72 hours at 3×10^6 cells/ml in RPMI media supplemented with L-glutamine, penicillin-streptomycin, 20% fetal calf serum and concavalin A (Flow Laboratories) mitogen to stimulate proliferation of T-lymphocytes.

For the MN assay, cytochalasin B (Sigma) ($6 \mu\text{g/ml}$) was added for the last 28 hours

of culture. MN are found in cytoplasm of cells and are analyzed in cells that have divided once following animal blood sampling. Cytochalasin B prevents cytokinesis and produces binucleated (BN) cells which can be easily scored for MN (Fenech, 1993). SCE and CA assays were conducted within the same cultures. For SCE/CA cultures, bromodeoxyuridine (BrdU) (ICN) ($6 \mu\text{g/ml}$) was added for the last 48 hours of culture. BrdU is incorporated in replicating DNA as a substitute for thymidine that will, following two cell divisions, be incorporated in both strands of one chromatid and in only one strand of the other chromatid. This differential chromatid incorporation pattern of BrdU, followed by application of the fluorescent-photolyse-Giemsa (FPG) staining, results in uniform or harlequin staining of chromosomes inside cells that have divided once or twice, respectively (Perry and Wolff, 1974). This harlequin staining pattern permits identification of SCEs in cells that have divided twice and analysis of CAs in first division cells. Only first division metaphases should be analyzed for CAs since these can be lost or appear in altered form in subsequent cell divisions (Bender et al., 1988). For SCE/CA cultures, colchicine (Sigma) was added one hour before harvest of cells to block dividing cells at metaphase. All cultures were harvested at 72 h by centrifugation. The cells were then swelled with hypotonic agent KCL 0.075M for 5 min for MN cultures or 25 min for SCE/CA cultures and fixed 3 times with methanol/acetic acid (5:1). Fixed cell suspensions were dropped on slides and air dried. Slides prepared for MN assay were stained with Giemsa (Sigma) 3% 10 min. Slides prepared for SCE/CA analysis were stained, following a modified version of the FPG technique of Perry and Wolff (1974), with $0.5 \mu\text{g/ml}$ Hoescht 33258 (bis-benzimidazole) (ICN) 15 minutes, covered with 2 x SSC solution and a coverslip and exposed to 365 nm UV

light at 37°C 15 minutes, immersed in 2x SSC at 60°C 20 minutes, rinsed, air dried and stained 7 minutes with Giemsa 3%.

Analysis

MN were scored for all cultures according to established criteria (Countryman and Heddle, 1976, Fenech, 1993), with previously described specifications (Gauthier et al., in press a). The cytokinesis-blocked proliferation index, which measures the average number of cell cycles per cell, for the MN cultures were calculated for each culture as $CBPI = 1(M1) + 2(M2) + 3(M3+M4) / N$, where M1 to M4 represent the number of cells with 1 to 4 nuclei and N is the total number of cells scored (Surrallés et al., 1995). For each culture, at least 1000 BN cells were scored for CBPI, MN cells (MNC) and total MN at 400X magnification and presence of MN was confirmed at 1000X magnification. MN frequencies are presented as numbers of MNCs or total MN per 1000 BN cells

Thirty second division metaphase spreads were analyzed for SCEs for each beluga whale culture at 1000x magnification. However, the small blood sample obtained from Mauyak along with the low lymphocyte proliferation rate found in this animal permitted the analysis of SCEs in only 20 second division cells. Frequencies are shown as number of SCEs per cell. The proliferation rate index used for the SCE assay was calculated using 200 cells for each culture as $PRI = 1(M1) + 2(M2) + 3(M3)/N$, where M1 to M3 indicating respectively metaphases in first, second or third cell division and N is the total number of cells scored (Ivett and Tice, 1982).

One hundred first division metaphase spreads were analyzed for structural CAs in

beluga whale cultures. Analyzed CAs include gaps, breaks, fragments, dicentrics, rings and tri- and quadriradial figures. The resultant fragment may or may not accompany the broken chromosome. The mitotic index, which measures the relative proportion of cells that have divided, was calculated using 2000 cells for each culture as $MI = \text{number of cells in metaphase} \times 100 / \text{number of cells in interphase}$. Frequencies of CAs with and without gaps and MI values are shown as percentages.

Statistical analysis

In most cases, the data met the criteria of normality and homoscedasticity. In the few cases that did not meet these exigencies, heterogeneity of variance and deviation from normality was small. Parametric tests were therefore used to analyse all data. Harp and grey seals were combined for interspecific analyses of MNC frequency and CBPI values due to small sample size. The small sample size precluded statistical analysis of putative intraspecific differences in seals. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to test for differences in MNC frequencies and CBPI values between species, sex and/or age group (< vs >15 years old) in beluga whales, bottlenose dolphins and seals, and in SCE and CA frequencies and PRI and MI values between sex and age group in beluga whales. A one-way ANOVA was also used to test for differences between bottlenose dolphins with and without health concerns. Differences in age of individuals and proportions of females and males between species were tested using a ANOVA and Chi-square test, respectively. Regression analysis was performed to test for relationships for each cytogenetic variable and age, where the Y axis represents either MNC, SCE, or CA frequencies, or CBPI, PRI or MI values and

the X axis represents age of the animals. All statistical analyses were analyzed at the 0.05 level of significance and were conducted using Minitab (Minitab software Inc. release 8, State College, PA).

RESULTS

Micronuclei analyses in marine mammals

Typical BN cells with and without a MN are shown in Figure 6.1. Results for MNC and total MN frequencies and CBPI in peripheral blood lymphocytes of beluga whales, bottlenose dolphins, harp and grey seals are shown in Table 6.2. MNC and total MN frequencies ranged between 2 and 14. Differences between total MN and MNC frequencies indicate that some animals had certain MNCs containing more than one (2 or 3) MN. MNC frequency was statistically similar between beluga whales and bottlenose dolphins ($p=0.680$), beluga whales and seals ($p=0.190$) and bottlenose dolphins and seals ($p=0.399$). Similar results were obtained when only grey seal samples were used to compare interspecific differences with beluga whales ($p=0.085$) and bottlenose dolphins ($p=0.202$). Age of individuals and proportions of females and males were statistically similar between belugas, dolphins and grey seals ($p=0.218$ and $X^2=1.270$, $p=0.736$, respectively), indicating that these are not factors influencing interspecific variations in MNC frequency. No significant differences were found between MNC frequencies in female and male beluga whales ($p=0.779$), but the highest value was observed in the 12.5 month pregnant female. Contrary to beluga whales, female bottlenose dolphins had significantly greater frequencies of MNCs than males ($p=0.044$). MNC frequencies in lactating females appeared to be

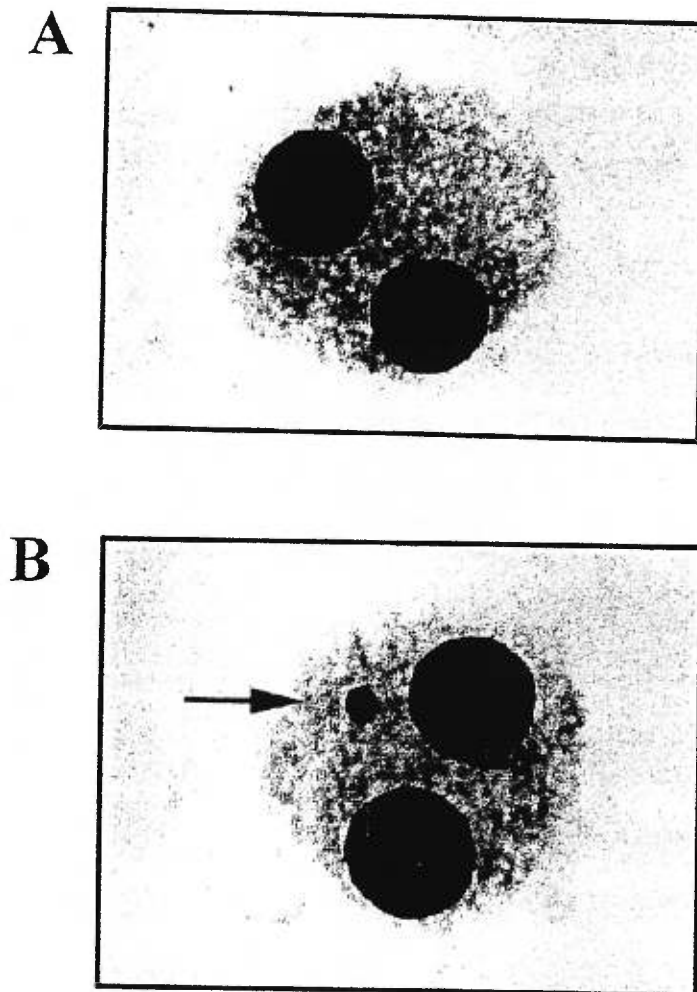


Figure 6.1: Typical BN lymphocyte without (A) and with a MN (B) from a beluga whale.

The MN is indicated by an arrow.

Table 6.2: Frequencies of MNCs and total MN per 1000 BNCs and CBPI values in blood lymphocytes of beluga whales, bottlenose dolphins, harp and grey seals.

Animal	Sex	CBPI	MNCs/1000 BNCs	Total MN/1000 BNCs
<i>Delphinapterus leucas</i>				
Aurora	F	1.40	3	3
Immiayuk	F	1.42	5	5
Puiji	F	1.45	8	12
Allua	F	1.42	4	4
Mauyak	F	1.41	13	14
Kavna	F	1.35	7	7
Imaq	M	1.42	8	8
Nanuq	M	1.38	6	6
Inuk	M	1.43	4	4
Females		1.41 ± 0.03	6.7 ± 3.6	7.5 ± 4.5
Males		1.41 ± 0.03	6.0 ± 2.0	6.0 ± 2.0
All		1.41 ± 0.03	6.4 ± 3.0	7.0 ± 3.8
<i>Tursiops truncatus</i>				
FB109	F	1.37	3	4
FB003	F	1.54	11	12
FB079	F	1.41	7	7
FB111	F	1.48	12	12
FB144	M	1.55	2	2
FB128	M	1.55	4	4
FB142	M	1.55	7	7
FB010	M	1.51	7	7
FB046	M	1.49	11	11
Females		1.45 ± 0.08	8.3 ± 4.1	8.8 ± 4.0
Males		1.53 ± 0.03	6.2 ± 3.4	6.2 ± 3.4
All		1.49 ± 0.07	7.1 ± 3.7	7.3 ± 3.7

<i>Phoca groenlandicus</i>				
Pg-1	M	1.21	7	7
Pg-2	M	1.35	6	6
<i>Haliechoerus grypus</i>				
Caroline	F	1.49	7	9
Chloé	F	1.44	13	13
Chinook	M	1.51	9	11
All		1.48 ± 0.04	10.3 ± 3.1	11.0 ± 2.0
<i>Seals</i>				
All		1.41 ± 0.12	8.8 ± 3.0	9.2 ± 2.9
<i>Marine mammals</i>				
All		1.44 ± 0.08	7.1 ± 3.2	7.6 ± 3.5

similar to those of other dolphins. A significant positive relationship was found between MNC frequency and age in bottlenose dolphins ($y=2.98+0.344x$, R^2 adjusted= 45.6%, $p=0.027$) (Figure 6.2), but this relationship was not observed for beluga whales ($p=0.511$). No differences in MNC frequencies were found between animals under and over 15 years of age in bottlenose dolphins ($p=0.127$) or beluga whales ($p=0.309$). Lymphocytes of young bottlenose dolphins (2-4 years old) showed the lowest MNC frequencies. No significant differences were found for MNC frequencies between bottlenose dolphins with and without health concerns ($p=0.796$).

CBPI values in marine mammal cells ranged between 1.21 and 1.55, indicating a 2.7-fold difference in frequencies of BN cells between individuals (Table 6.2). However, when harp seal frozen samples were omitted from the comparison, differences were only 1.4-folds. Thus, harp seal samples were excluded from further statistical analysis on CBPI values. CBPI values were significantly lower in beluga whales than in bottlenose dolphins ($p=0.003$) and grey seals ($p=0.002$), but similar in bottlenose dolphins and grey seals ($p=0.729$). CBPI values were similar in both sexes of beluga whales ($p=0.763$) and bottlenose dolphins ($p=0.062$). No relationship between CBPI values and age were found for beluga whales ($p=0.490$) and bottlenose dolphins ($p=0.833$). Moreover, similar CBPI values were observed between age groups for both these species ($p=0.763$ and $p=0.582$, respectively). No significant differences were found for CBPI values between bottlenose dolphins with and without health concerns ($p=0.405$).

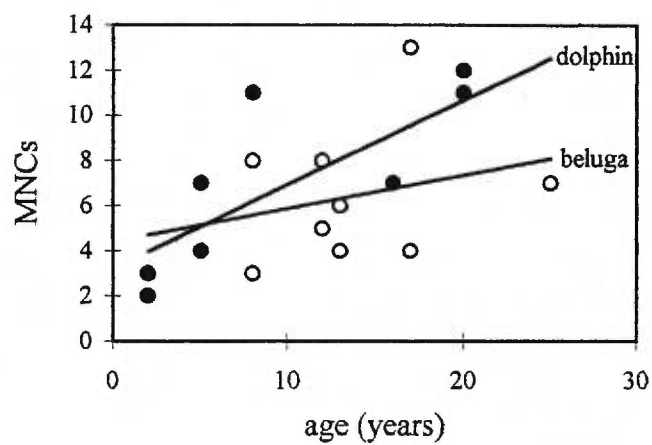


Figure 6.2: Effect of age on MNC frequency in lymphocytes of beluga whales (○) and bottlenose dolphins (●).

Sister chromatid exchange and chromosome aberration analyses in beluga whales

An example of a second division metaphase with SCEs of a beluga whale peripheral blood lymphocyte is shown in Figure 6.3. Frequencies of SCE per cell varied between 1 and 15 and overall mean frequency was 5.3 (Table 6.3). An example of a normal first division beluga whale lymphocyte with a $2n=44$ karyotype is illustrated in Figure 6.4. Examples of CAs observed in beluga whale lymphocytes are presented in Figure 6.5. Structural CAs were found to be chromatid-type aberrations, except for acentric fragments which were either observed as chromatid- or chromosome-type aberrations. No dicentrics, rings or radial figures were observed. Two-thirds of observed acentric fragments were considered chromatid-type lesions. Structural CAs comprised mostly gaps (48%), followed by breaks (32%) and acentric fragments (21%) (Table 6.4). Breaks were found accompanied with the deleted acentric fragment in 22% of cases. Notwithstanding gaps, all metaphases contained only one CA event, with the exception of one cell from Nanuq which contained 2 different CAs. Mean frequencies of SCE were 0.9 SCE/cell higher in females than in males, but these differences were not statistically significant ($p=0.065$). Frequencies of total CA and total CA excluding gaps were similar in both sexes ($p=0.475$ and $p=0.170$, respectively) (Table 6.5). No significant relationships were found between age and frequencies of SCE ($p=0.863$) and CA with or without gaps with age ($p=0.096$ and $p=0.280$, respectively). When beluga whales aged under 15 years were compared with those aged over 15 years, no age group differences were observed for frequencies of SCE ($p=0.842$) and CA with or without gaps ($p=0.071$ and $p=0.516$, respectively).

PRI values ranged between 1.06 and 1.35, indicating a 5-fold difference in



Figure 6.3: Example of a second division metaphase spread with SCEs from a beluga whale lymphocyte. The seven SCEs are indicated by arrows.

Table 6.3: Mean frequencies of SCEs per cell for a total of 30 cells* and PRI values in blood lymphocytes of beluga whales.

Beluga	Sex	PRI	SCEs/cell	Range of SCEs/cell
Aurora	F	1.27	5.8 ± 2.1	3-15
Immiayuk	F	1.06	6.3 ± 2.1	1-10
Puiji	F	1.08	5.3 ± 1.9	2-9
Allua	F	1.26	5.5 ± 1.8	2-9
Mauyak*	F	1.08	5.7 ± 1.8	3-9
Kavna	F	1.09	4.9 ± 1.5	2-8
Imaq	M	1.18	5.5 ± 2.3	1-8
Nanuq	M	1.29	4.2 ± 1.7	2-7
Inuk	M	1.35	4.5 ± 1.5	1-11
Females		1.14 ± 0.10	5.6 ± 0.5	1-15
Males		1.27 ± 0.09	4.7 ± 0.7	1-11
All		1.18 ± 0.11	5.3 ± 0.7	1-15

*Only 20 second division metaphases were analyzed in this animal.

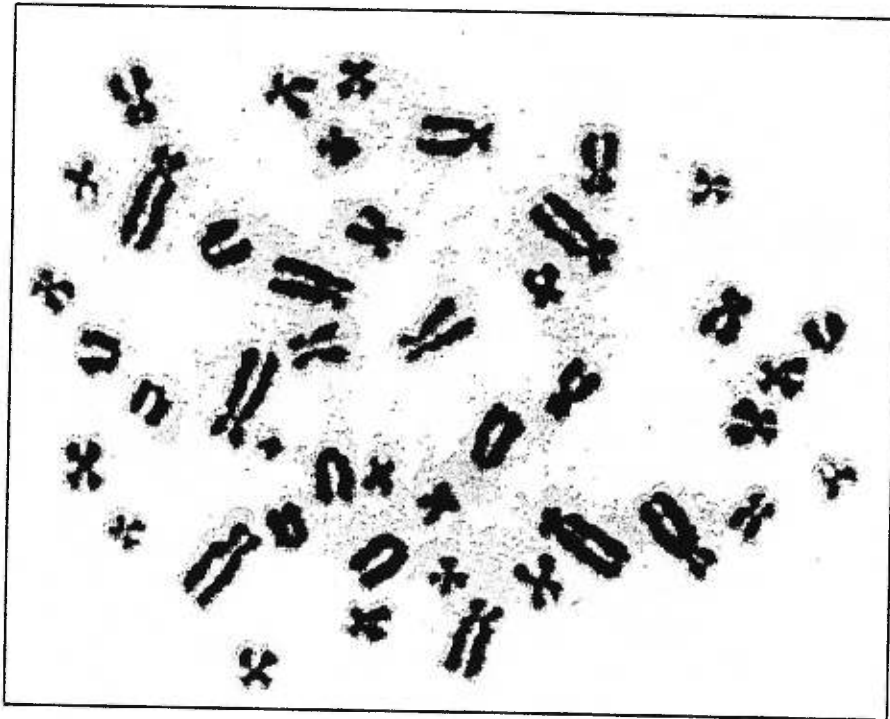


Figure 6.4: Example of a normal first division metaphase ($2n=44$) from a beluga whale lymphocyte.

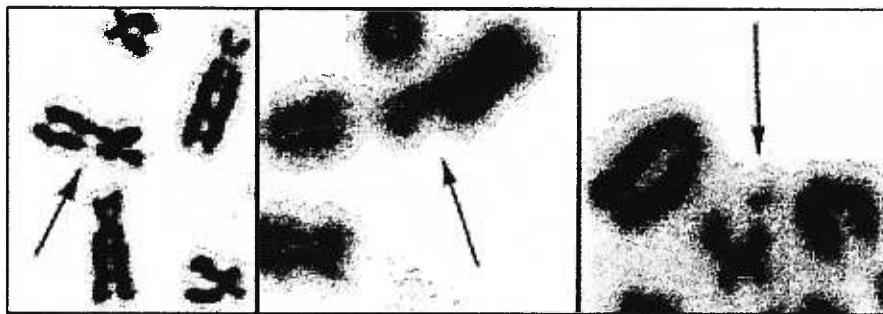


Figure 6.5: Examples of chromatid breaks in first division beluga whale lymphocytes.

Table 6.4: Mean frequencies of individual categories of CAs and total CAs with and without gaps per 100 cells and MI values in blood lymphocytes of beluga whales. All structural CAs were found to be chromatid-type aberrations, except for acentric fragments which were either observed as chromatid- or chromosome-type aberrations.

Beluga	Sex	MI	Gaps	Breaks	Acentric fragment		Total	Total
					chro- matid	chromo- some	CAs with gaps§	CAs without gaps§
Aurora	F	1.02	4	2*	3	0	8	4
Immiayuk	F	0.55	4	5	0	1	10	6
Puiji	F	0.69	4	4	0	0	8	4
Allua	F	1.19	5	1*	4	0	9	4
Mauyak	F	0.40	4	2	1	1	8	4
Kavna	F	0.97	6	2	4	0	12	6
Imaq	M	1.01	4	2*	2	2	9	5
Nanuq	M	0.85	2	5*	2	0	8	6
Inuk	M	0.44	8	4**	4	0	14	6

* and **: One(*) or two(**) of the breaks were found with resulting acentric fragment, respectively.

§: Breaks with resulting fragment were counted as one clastogenic event when compiling total number of CAs.

Table 6.5: Mean frequencies of total CAs with and without gaps per 100 cells and MI values in blood lymphocytes of female and male beluga whales.

Sex	MI	total CAs with gaps	total CAs without gaps
Females	0.80 ± 0.31	9.17 ± 1.60	4.67 ± 1.03
Males	0.77 ± 0.29	10.33 ± 3.21	5.67 ± 0.58
All	0.79 ± 0.28	9.56 ± 2.13	5.00 ± 1.00

frequencies of second division metaphases between individuals (Table 6.3). MI values varied between 0.55 and 1.19, showing a 2-fold variability in this division index (Table 6.4). PRI and MI values were similar in female and males ($p=0.086$ and $p=0.868$, respectively). No significant relationship was found between PRI or MI and age ($p=0.118$ and $p=0.554$, respectively) and no differences were observed in these variables between age groups ($p=0.213$ and $p=0.172$, respectively).

DISCUSSION

This study is part of a long term monitoring program on the toxicological health of St. Lawrence beluga whales and Sarasota Bay bottlenose dolphins (Hansen and Wells, 1995; Sweeney et al., 1995; Martineau et al., 1994). Since increases in chromosome damage in peripheral blood lymphocytes may reflect risk of cancer, teratogenicity and other diseases (Carrano and Natarajan, 1988; Nordic Study Group, 1990; De Ferrari et al., 1991; Duffaud et al., 1997), the MN, SCE and CA assays could be used to assess the long term health of marine mammal populations. The MN, SCE and CA assays were successfully developed as biomarkers of genotoxic damage in lymphocytes of beluga whales, bottlenose dolphins, grey and harp seals. The MN assay was the simplest, fastest and assured the most reliable coloration results. However, the three assays should be used complementary since they analyzed different types of DNA damage which can have dissimilar sensitivities to environmental chemicals (Carrano and Natarajan, 1988; Fenech, 1993; Tucker et Preston, 1996).

Comparisons of values obtained from marine mammal lymphocytes of this study

with lymphocytes of healthy terrestrial mammals must be interpreted with caution since culture conditions and methodologies often vary between studies. MNC and total MN frequencies in marine mammals of this study were within the lower range reported for cows (\bar{x} =6.8-24.6, depending on the study, range=4-42) and humans (\bar{x} ~10, range=1-80) (Scarfi et al., 1993; Fenech et al., 1994; Duffaud et al., 1997). SCE frequencies in beluga whales were in the lower range reported in cows (\bar{x} =4.8-6.4, range=0-22), and lower than in goats (\bar{x} =6.6, range=0-18), sheeps (\bar{x} =6.5 and 9.5), humans (\bar{x} =8.3, range=1-21) and river buffalos (\bar{x} =8.8) (Dunkelberg and Krames, 1984; Bender et al., 1988; Iannuzzi et al., 1988, 1991; Catalan et al., 1993; Di Meo et al., 1993; Gebel et al., 1996). On the contrary, total CA frequencies excluding gaps in beluga whales were higher than or in the higher range of those reported in other mammals (humans: \bar{x} =0.08-4.5, range=0-15, deers: \bar{x} =2.3, pigs: \bar{x} =3.6, cows: \bar{x} =1.9-3.7) (Rubeš, 1987; Bender et al., 1988; Rubeš et al., 1992, 1997; Ganguly, 1993; King et al., 1994). It is possible that BrdU (6 μ g/ml) induced CAs in beluga whale lymphocytes. Although BrdU does not cause CAs in human lymphocytes at or below 6 μ g/ml, CAs can be induced at higher concentrations (Lambert et al., 1976). BrdU was also used to facilitate selection of first division metaphases by Rubeš (1987), Bender et al. (1988), and Ganguly (1993). When comparisons are made for the same species, CA frequencies reported by these authors were respectively within the range or higher than those reported by Rubeš et al. (1992, 1997) and King et al. (1994) that did not use BrdU for their CA analyses. Moreover, other culture parameters may explain differences in CA frequencies observed between these studies. Mean frequencies of gaps in beluga whales were in the mid-range of those reported in humans (\bar{x} =0.6-8.1) (Galloway et al., 1986;

Bender et al., 1988; King et al., 1994). CBPI values in marine mammals of this study were similar to those reported in cows (\bar{x} =1.46) (Scarfi et al., 1993). PRI values in beluga whales were lower than in cows (\bar{x} =1.82) and sheep (\bar{x} =1.40-1.58) and MI values were lower than in humans (\bar{x} =4.66, range=1.05-9.87) (Dunkelberg and Krames, 1984; Catalan et al., 1993; Ganguly, 1993; Gebel et al., 1996).

Factors such as species, sex, age, reproductive status, general health status, genetic factors and environmental contamination can be important variables affecting levels of chromosomal damage and cell proliferation in human and animal cells (Carrano and Natarajan, 1988). Health concerns were found in four dolphins but CBPI values and MN frequencies were similar to those of healthy dolphins. This may indicate that these health concerns did not play a role on MN induction and lymphocyte proliferation for these animals. Higher MNC frequencies observed in female compared to male bottlenose dolphins have been reported in the majority of studies on human lymphocytes and has been explained by the preferential involvement of X chromosomes in somatic aneuploidy in females (Fenech et al., 1994; Richard et al., 1994; Zijno et al., 1996). An age-related increase in MNC was found in bottlenose dolphins. Several studies have reported increased chromosomal damage as function of age in mammals, which may be due to accumulation of DNA damage, including loss of X chromosomes in females, and decrease of DNA repair competence (Das and Sharma, 1983, Dunkelberg and Krames, 1984, Tice and Setlow, 1985, Ganguly, 1993, King et al., 1994, Richard et al., 1994, Zijno et al., 1996). However, some studies have shown absence of sex-related differences in chromosome damage (Bender et al., 1988; Heddle, 1990). A greater sample size is needed to further test these hypotheses

in beluga whales. Similarly to beluga whales, most studies have found that the baseline frequency of SCE is slightly, but not statistically, higher (mean of 0.5 SCE/cell) in females than in males (Carrano and Natarajan, 1988; Di Meo et al., 1993). Higher frequencies of MNC, but not SCE and CA, were observed in 12.5 months pregnant beluga whale Mauryak. Lymphocytes of women and muntjacs in late pregnancies have shown higher frequencies of SCE and X-ray induced CA and this has been explained by altered hormonal and physiological status during pregnancy (Sharma and Das, 1986). Contrary to observations in other mammalian species, no age-related decrease in mitogen-induced lymphocyte proliferation was observed in beluga whales or bottlenose dolphins (Das and Sharma, 1983; Dunkelberg and Krames, 1984; Tice and Setlow, 1985; Ganguly, 1993). A wider age-span is needed to further test this relationship in these cetaceans.

Studies have shown statistically higher MN and CA frequencies in human, ungulate, fish and invertebrate populations exposed to high concentrations of PAHs, OCs and/or heavy metals compared to those exposed to low levels of these compounds (Skerfving et al., 1974; Rubeš, 1987; De Flora et al., 1991; Perera et al., 1992; Rubeš et al., 1992, 1997; Franchi et al., 1994; AlSabti and Metcalfe, 1995). Lack of interspecific differences in MN frequencies between beluga whales, bottlenose dolphins and seals may be due to similar exposure to putative genotoxic environmental contamination, together with the similar age-span and female and male proportions observed between species and similar culture conditions applied for all samples. West Hudson Bay Arctic beluga whales, Northwestern Atlantic seals and Sarasota Bay bottlenose dolphins are considered to be healthy populations and are exposed to relatively low and similar concentrations of environmental contaminants (Muir

et al., 1990; Scott et al., 1990; Lahvis et al., 1993; Béland et al., 1992; Vedder et al., 1993; D. J. St. Aubin, pers. comm.). Although certain free-ranging grey seals have relatively high concentrations of certain environmental compounds in their tissues (Béland et al., 1992), low concentrations are expected to be found in animals that were born in captivity or have been in captivity for long periods of time. Captive beluga whales and seals of this study are mostly fed northern Pacific or northern Atlantic herring which are believed to have similarly low levels of environmental contamination. Differences in lymphocyte CBPI values between beluga whales and bottlenose dolphins and grey seals may be explained by interspecific differences in cell cycle kinetics, as reported for other mammalian species (Leonard et al., 1982; Rubeš et al., 1992).

Frequencies of SCE in beluga whales were similar to those reported in lymphocytes of Baltic grey seal pups and adult ring seals (*Phoca hispida*) (SCE: \bar{x} = 4.5, range=0-14) (Hongell, 1993). Total CA frequencies excluding gaps in beluga whales were within the same range as those found in Baltic grey seal pups (\bar{x} =3.3-7.7 depending on year of sampling, range=0-21) and higher than in Baltic adult ring seals (\bar{x} =2.2, range=0-3). Because Baltic seals are more highly exposed to environmental contamination than arctic beluga whales (Muir et al., 1990; Olsson et al., 1994), lower frequencies of SCE and CA were expected in Arctic beluga whales. However, contrary to Arctic beluga whales, metaphases with multiple CAs, multiple fragmentations of the chromosomes and more complicated and rarer aberrations such as quadriradials were found in Baltic seals (Hongell, 1993). Complicated rearrangements such as quadriradials are considered to be very rare and are more usually observed in humans with cancer and/or exposed to genotoxic compounds

than in healthy human subjects (Aurias, 1993; De Ferrari et al., 1993). Moreover, in addition to differences in culture conditions and methodologies, there may be interspecific differences in genetic factors, sex proportions and age-span contributing to differences in SCE and CA endpoints between the studies (Carrano and Natarajan, 1988).

In the future, analysis of MN, SCEs and CAs as biomarkers of genotoxicity could be used to compare DNA damage between relatively unexposed and highly exposed populations of marine mammals. A greater number of samples, especially from individuals in their natural habitat, is needed to conclude a more reliable frequency of spontaneous chromosome damage in each marine mammal species. Future possibilities to obtain additional bottlenose dolphin samples for DNA damage assessment through well-tested and safe capture-release operations in Sarasota Bay represent ideal opportunities to increase knowledge of DNA damage in a large sample size from a well documented wild marine mammal population. Analysis of OC compounds and heavy metals could be used as a general contamination index and as a basis for analysis of a putative association between chemical contamination and genotoxic potential in bottlenose dolphins and other marine mammals. Genotoxic biomarkers could act, together with measurement of other health parameters and analysis of environmental contamination, as a basis for a multiple response assessment in a non-destructive approach to predict the impact of pollution in marine mammals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would especially like to thank Clint Wright and marine mammal staff at the

Vancouver Aquarium, Jeff Boehm, Ben Houston and Ken Ramirez at the J. G. Shedd Aquarium, Clément Lanthier of the Société zoologique de Granby, and Marc Dufresne for collection of beluga and seal blood samples. We would like to extend special thanks to Michael Scott, Howard Rhinehart, Jocelyn Vedder, Blair Irvine, Jay Sweeny, Forrest Townsend, Sue Hofmann, Kim Urian, and all the other members of the 1997 dolphin capture-release crew. Funding for the Sarasota Bay bottlenose dolphin capture-release project was provided by Dolphin Quest, through the efforts of Jay Sweeney and Rae Stone. Sampling of Sarasota Bay bottlenose dolphins was conducted under the US National Marine Fisheries Service (NMFS) Scientific Research Permit No. 945. This work was funded by the Fonds pour la Formation de Chercheuses et Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Québec, the US Environmental Protection Agency (EPA), the Programme d'aide à la recherche de l'UQAM and the Energy and Geoscience Institute at the University of Utah. Graduate support for J. M. Gauthier was supplied by an FCAR Ph.D. scholarship and the EPA.

CHAPITRE 7

DISCUSSION

Cet ouvrage fait partie d'un projet à long terme sur l'implication possible des contaminants environnementaux dans l'étiologie du cancer chez les bélugas du St-Laurent ainsi que chez d'autres mammifères marins (Hansen et al., 1995; Martineau et al., 1994). Environ 37% des tumeurs rapportées à travers le monde chez les cétacés ont été retrouvées chez les bélugas du St-Laurent, population fortement exposée à la pollution environnementale (Martineau et al., 1994). L'induction tumorale par les contaminants environnementaux pourrait être responsable de l'incidence élevée de cancer observée chez les bélugas du St-Laurent (DeGuise et al., 1995; Martineau et al., 1994). Puisque les atteintes du matériel génétique, telles que les mutations, les lésions chromosomiques et l'aneuploïdie, sont associées à un risque accru de cancer, de tératogénèse et de maladies chromosomiques (Oshimura et Barrett, 1986; Tucker et Preston, 1996), la fréquence de ces événements pourrait être utilisée à titre d'indicateur pour l'évaluation à long terme de la santé des populations de mammifères marins exposées à des contaminants environnementaux.

Les techniques de détection de dommages chromosomiques, tels que celles des MN, ECS et AC, sont déjà utilisées à ces fins tant chez l'humain que chez diverses populations animales (Carrano et Natarajan, 1988; Nordic Study Group, 1990; De Ferrari et al. 1991; Duffaud et al. 1997). Ces techniques sont sensibles à l'induction d'une très grande variété d'agents génotoxiques et sont rapides et peu coûteuses. Cependant

seulement deux publications portent sur leur utilisation chez les mammifères marins (Betti et Nigro, 1996; Hongell, 1996).

Notre étude visait à adapter et appliquer ces techniques à l'étude de l'exposition génotoxique chez les mammifères marins. Dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel génotoxique *in vitro* de contaminants environnementaux retrouvés couramment dans les carcasses des bélugas du St-Laurent. Dans un deuxième temps, afin d'être en mesure de démontrer une augmentation de la fréquence des atteintes génotoxiques chez les populations de mammifères marins exposés à des contaminants dans leur environnement, nous avons déterminé les fréquences de base de ces lésions dans diverses populations relativement peu exposées à ces composés.

7.1 Évaluation du potentiel génotoxique *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel génotoxique *in vitro* de contaminants environnementaux retrouvés couramment dans les carcasses des bélugas du St-Laurent. Ces études ont été effectuées sur des fibroblastes de peau provenant d'un béluga de l'arctique et avec la technique de MN. Le choix des contaminants a été fait sur la base de leur potentiel génotoxique démontré pour les cellules de d'autres animaux, ainsi que de leurs concentrations relativement élevées chez les bélugas du St-Laurent ou dans leur environnement. La technique de MN a été utilisée avec succès pour évaluer les effets génotoxiques *in vitro* des composés de mercure (Hg et MeHg), d'HAPs (BP seul et un mélange de BP, BA, DBA, BF et chrysène) et d'OCs (toxaphène, chlordane et DDT) dans les fibroblastes d'un béluga.

La fréquence spontanée (avant exposition) de MN dans les fibroblastes de béluga ATP-95-8 cultivés durant 7 à 10 passages (5 à 11%) se situait dans les limites inférieures des valeurs rapportées pour des fibroblastes de peau humains (3 à 22%) cultivés pendant 3 à 14 passages et prélevés d'individus adultes sains et ayant des karyotypes normaux (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992). La mitomycine C (MMC) et le BP ont été utilisés comme agents de contrôle positif car ils sont des mutagènes reconnus qui agissent respectivement de façon directe (sans S9) et indirecte (avec S9) sur l'ADN. Le BP a donc été utilisé à la fois comme agent à tester et agent de contrôle positif. Il a été démontré que ces agents induisaient des lésions à l'ADN au niveau chromosomique dans les cellules de d'autres mammifères et ce, à des concentrations semblables à celles utilisées dans cet ouvrage (Wakata et Sasaki, 1987; Rudd et al., 1991; Ellard et al., 1991; Vian et al., 1993). Bien que selon nos résultats le MMC et le BP soient des inducteurs plus puissants de CMNs, des augmentations significatives de la fréquence de CMNs et des baisses significatives de l'indice de prolifération après blocage de la cytokinèse ont été obtenues avec l'accroissement de la concentration pour le Hg, le MeHg, le toxaphène, le chlordane et le DDT en absence de S9 et pour le BP et le mélange d'HAPs en présence de S9. Des augmentations significatives ont été observées pour les concentrations de 0.5, 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$ de Hg, de 0.05, 0.5 et 2 $\mu\text{g/ml}$ de MeHg et de BP, de 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$ du mélange d'HAPs, de 0.05, 0.5, 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ de toxaphène, de 2, 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ de chlordane, et de 10 et 15 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-DDT. Ces résultats indiquent que ces composés possèdent un potentiel génotoxique chez les fibroblastes de béluga lorsqu'ils sont exposés *in vitro*.

Afin d'évaluer la sensibilité relative des fibroblastes aux composés étudiés, des comparaisons ont été effectuées avec d'autres études réalisées chez d'autres espèces. Ces comparaisons doivent cependant être faites avec précaution car les méthodologies, les tests, ainsi que le nombre d'individus utilisés varient selon les études.

Les composés mercuriels peuvent causer des brisures monocaténares à l'ADN et, plus particulièrement pour le MeHg, l'aneuploïdie induite par la c-mitose, elle-même induite par la liaison aux groupes sulfhydryls des protéines de la tubuline de l'appareil mitotique (DeFlora et al., 1994). La réduction de la prolifération cellulaire et la cytotoxicité induite par les composés du mercure sont possiblement dues à l'inhibition de la synthèse protéique, ainsi qu'aux interactions avec les microtubules, les membranes et les organelles cellulaires (Miura et Imura, 1987; Cantoni et Costa, 1983). Dans la présente étude, la suppression de la division cellulaire et de la survie des cellules a été observée à des concentrations de Hg (5 et 20 $\mu\text{g/ml}$) et de MeHg (2 $\mu\text{g/ml}$) similaires à celles rapportées pour différents types de cellules de mammifères, tels que les lymphocytes humains et les fibroblastes de hamster chinois (Cantoni et Costa, 1983; Betti et al., 1992; Ogura et al., 1996). Des brisures dans les brins de l'ADN analysés par l'essai Comet ont été observées dans les lymphocytes d'un dauphin exposés à 1 et 2 $\mu\text{g/ml}$ de MeHg, concentrations comparables à celles utilisées dans cette étude (Betti et Nigro, 1996). La sensibilité des fibroblastes de béluga à l'activité génotoxique du Hg et du MeHg semble toutefois être plus grande que celle observée dans les fibroblastes de hamster chinois et les lymphocytes humains cultivés selon un protocole semblable à celui utilisé dans cette étude. Chez les fibroblastes de béluga, des augmentations de la fréquence de CMNs entre

2 et 4 fois étaient induites à des concentrations variant de 0.5 à 5 $\mu\text{g/ml}$ Hg et 0.05 à 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg. Contrairement à cette étude, aucune augmentation de la fréquence des MN et des ACs n'a été décelée lorsque ces cellules étaient exposées à des concentrations variant de 0.27 à 3 $\mu\text{g/ml}$ de Hg et de 0.3 à 1.25 $\mu\text{g/ml}$ de MeHg, alors qu'une augmentation de 2 à 3 fois était induite à des concentrations variant entre 2.7 et 15 $\mu\text{g/ml}$ de Hg et 1.5 et 4.5 $\mu\text{g/ml}$ de MeHg (Betti et al., 1992; Ogura et al., 1996; Yamada et al., 1993). Aucun plateau dans l'induction des MN n'a été atteint pour les concentrations de Hg et de MeHg utilisées dans la présente étude. Ceci correspond aux résultats de d'autres études qui ont testé des concentrations similaires de MeHg dans les lymphocytes humains (Betti et al., 1992; Ogura et al., 1996). Les fibroblastes de béluga BNs contenant entre 2 et 4 MN ont été surtout observés aux concentrations les plus élevées de mercure (5 et 20 $\mu\text{g/ml}$ Hg et 2 $\mu\text{g/ml}$ MeHg). En parallèle, une augmentation du nombre d'ACs par cellule a été observée pour des lymphocytes humains exposés à des concentrations similaires de MeHg (Betti et al., 1992).

Le toxaphène est un composé électrophile réactif pour l'ADN et est le seul OC retrouvé dans les tissus des bélugas qui soit reconnu comme mutagène (Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990; Ashby et Tennant, 1991). Certain auteurs ont suggéré que les OCs, tels que le DDT, l'hexachlorobenzène et les biphényles polychlorés, pourraient agir comme agents turbagènes par l'inactivation du fuseau mitotique (Al-Sabti et Metcalfe, 1995; Parry et al., 1996; Canonero et al., 1997). Bien que des résultats contradictoires aient été rapportés quant au potentiel génotoxique du p,p'-DDT et du chlordane, il a été démontré que ces composés pouvaient induire des lésions chromosomiques et la diminution de la

prolifération cellulaire dans les cellules humaines et animales exposées *in vitro* à des concentrations similaires à celles utilisées dans cette étude (Palmer et al., 1972; Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990). Des concentrations variant entre 2 et 20 $\mu\text{g/ml}$ de toxaphène ont induit des ECSs et une réduction de la prolifération cellulaire en absence du mélange S9 dans des cellules lymphoïdes humaines et des fibroblastes de hamster chinois (Sobti et al., 1983; Steinel et al., 1990). Le chlordane a induit une augmentation significative d'ECSs dans les cellules lymphoïdes humaines en absence de mélange S9 à des concentrations de 4 $\mu\text{g/ml}$ (Sobti et al., 1983). La sensibilité des fibroblastes de béluga aux effets génotoxiques du p,p'-DDT en absence du mélange S9 semble être plus grande que celle des fibroblastes de hamster chinois qui n'ont pas montré d'augmentation de la fréquence d'ACs à 12 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-DDT. Cette sensibilité est toutefois moins grande que celle des cellules de rat kangourou qui ont montré une augmentation de 8 fois de la fréquence d'ACs à 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-DDT (Palmer et al., 1972; Mahr et Miltenburger, 1976).

Dans la présente étude, la présence du facteur métabolique externe S9 a grandement réduit ou a même éliminé les effets des pesticides OCs sur la prolifération cellulaire et l'induction des MN dans les fibroblastes de béluga. Ceci pourrait indiquer qu'il y a eu détoxification des OCs par les oxygénases à fonctions mixtes du mélange S9 et/ou par des interactions entre les OCs et les composantes du mélange S9 (Saleh, 1991; Steinel et al., 1990). La diminution de la prolifération cellulaire induite par le toxaphène et le p,p'-DDT a été attribuée aux dommages causés aux membranes cellulaires, possiblement à la suite d'interactions avec les lipides membranaires résultant de la nature

lipophile de ces composés (Mahr et Miltenburger, 1976; Byczkowski, 1977; Mourelle et al., 1985; Steinel et al., 1990). La nature plus hydrophile des métabolites des pesticides OCs (Matsumura, 1985) pourrait donc expliquer l'effet réduit de ces composés sur la prolifération cellulaire en présence du mélange S9. La réduction de la fréquence d'ECSs induites par le toxaphène a aussi été observée dans les cellules lymphoïdes humaines en présence de S9 (Sobti et al., 1983). Contrairement à la présente étude, l'induction des ECSs dans les cellules lymphoïdes humaines par le chlordane était plus élevée en présence qu'en absence du mélange S9 (Sobti et al., 1983). Par contre, l'addition du mélange S9 a éliminé l'induction de la synthèse non-programmée de l'ADN par le chlordane dans les fibroblastes humains (Ahmed et al., 1977). Les différences observées dans les effets du chlordane en présence et en absence de S9 résultent possiblement d'une sensibilité différentielle des tests utilisés et/ou de ces deux types cellulaires à l'activité génotoxique du chlordane. Le p,p'-DDT est principalement métabolisé en métabolite intermédiaire p,p'-DDE et en métabolite final p,p'-DDA par les oxygénases à fonctions mixtes (Matsumura, 1985). Des résultats contradictoires ont été rapportés quant au potentiel d'induction de dommages chromosomiques des différents composés du DDT (Palmer et al., 1972; Kelly-Garvet et Legator, 1973; Mahr et Miltenburger, 1976). Par contre, pour des concentrations similaires à celles utilisées dans cette étude (10 µg/ml), il a été démontré dans les cellules de rat kangourou que le p,p'-DDE et le p,p'-DDA ont un potentiel moins élevé pour l'induction d'ACs que le p,p'-DDT (Palmer et al., 1972). Ceci pourrait expliquer l'élimination de l'induction de MN dans les fibroblastes de béluga en présence de facteur métabolique externe.

Le métabolisme des HAPs génère des métabolites électrophiles qui se lient à l'ADN de façon covalente et des radicaux libres qui peuvent tous les deux conduire à la formation de MN et à la réduction de la prolifération cellulaire (Kim et al., 1995; Vienneau et al., 1995). La réduction de la division cellulaire a été observée dans les lymphocytes humains et les fibroblastes de hamster chinois à des concentrations de BP similaires à celles utilisées sur les fibroblastes de béluga (Ellard et al., 1991; Vian et al., 1993; Warshawsky et al., 1995). En présence du mélange S9, des augmentations de la fréquence des CMNs chez les fibroblastes de bélugas étaient entre 2 et 5.5 fois pour des concentrations de BP variant de 0.5 à 5 $\mu\text{g/ml}$. La sensibilité des fibroblastes de béluga aux effets génotoxiques du BP en présence de S9 semble être similaire à celle des fibroblastes de hamster chinois (Ellard et al., 1991), mais moins élevée que celle des fibroblastes primaires de peau de rat qui ont montré une augmentation de 4.5 fois de la fréquence des MN à 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de BP (Vienneau et al., 1995). Leur sensibilité est toutefois plus grande que celle des lymphocytes de sang humain qui n'ont pas montré d'augmentation de la fréquence des MN à 1.6 $\mu\text{g/ml}$ de BP et ont montré une augmentation de 2.6 fois à 3.9 $\mu\text{g/ml}$ de BP (Vian et al., 1993). Aucun plateau dans l'induction de MN n'a été observé pour les concentrations de BP utilisées dans la présente étude, ce qui est comparable aux résultats de d'autres études qui ont testé des concentrations similaires de BP dans les lymphocytes humains et les fibroblastes de hamster chinois (Ellard et al., 1991; Vian et al., 1993; Warshawsky et al., 1995).

Malgré que le BP soit souvent utilisé comme un composé modèle dans les études de génotoxicité des HAPs, il ne prédit pas nécessairement la génotoxicité d'un mélange

d'HAPs car les interactions entre les composés d'HAPs peuvent modifier la génotoxicité des composantes du mélange. Selon les composés en présence, ces interactions peuvent être synergiques, additives ou antagonistes (Haugen et Peak, 1983; Springer et al., 1989; Culp et Beland, 1994; Nesnow et al., 1995). Bien qu'il ait été démontré que les composantes individuelles du mélange d'HAPs utilisé dans cette étude autres que le BP, tels que le BA, le DBA, le BF et le chrysène, peuvent induire des adduits à l'ADN et la formation de MN dans les cellules de mammifères, le potentiel d'induction varie largement d'un composé à l'autre (He et Baker, 1991; Crofton-Sleigh et al., 1993; Ross et al., 1995). Le potentiel d'induction de MN apparemment moins élevé du mélange d'HAPs que du BP seul dans les fibroblastes de béluga suggère des effets moins qu'additifs ou encore antagonistes des composantes du mélange d'HAPs. La majorité des études ont démontré qu'un mélange de divers HAPs, incluant ceux utilisés dans cette étude, possède un potentiel moins élevé d'induction d'adduits d'ADN, de mutations et de MN que le BP seul, et ceci est probablement dû à l'inhibition compétitive des processus métaboliques impliqués dans la formation de métabolites réactifs de ces composés (Haugen et Peak, 1983; Springer et al., 1989; Reddy et al., 1991).

Grâce à une approche cytogénétique, l'analyse des MN, nous avons pu mettre en évidence les atteintes génotoxiques induites dans des cultures de fibroblastes de béluga exposées *in vitro* à des contaminants retrouvés chez les bélugas du St-Laurent ou leur habitat. L'utilisation de ces résultats pour l'estimation d'un risque pour la santé des bélugas exposés à ces mêmes contaminants dans leur environnement doit tenir compte des niveaux d'exposition qui y sont rencontrés. Ainsi, afin d'évaluer la pertinence

écotoxicologique des résultats de cet ouvrage, les concentrations des composés de mercure, d'OCs et d'HAPs induisant la formation de MN dans les fibroblastes de beluga ont été comparées avec celles du mercure et des OCs estimées dans le sang et/ou la peau de bélugas du St-Laurent et des HAPs retrouvés dans les sédiments de l'habitat de cet animal.

Dans cette étude, des concentrations faibles de Hg ($0.5 \mu\text{g/ml}$) et de MeHg (0.05 et $0.5 \mu\text{g/ml}$) ont induit des augmentations significatives dans la fréquence des MN dans les fibroblastes de béluga sans toutefois être accompagnées d'une baisse de prolifération cellulaire. Aucune donnée n'existe sur les concentrations de mercure dans le sang et la peau des bélugas. Cependant, la concentration moyenne de mercure, sur une base de poids frais, dans le foie des bélugas du St-Laurent est de $34 \mu\text{g/g}$ (étendue= 0.4 à $202 \mu\text{g/g}$), comparativement à $6.6 \mu\text{g/g}$ (0.02 à $25 \mu\text{g/g}$) chez les bélugas de l'arctique de l'ouest de la baie d'Hudson (Wagemann et al., 1990). D'après les concentrations totales de mercure sur une base de poids frais dans le foie ($\bar{x}=63 \mu\text{g/g}$, 0.2 à $218 \mu\text{g/g}$), le sang ($\bar{x}=0.4 \mu\text{g/g}$, 0.008 à $1.5 \mu\text{g/g}$) et la peau ($\bar{x}=1.9 \mu\text{g/g}$, 0.002 à $6.1 \mu\text{g/g}$) des dauphins tachetés (*Stenella attenuata*) de l'océan Pacifique (André et al., 1990), il est estimé que les concentrations sur une base de parties par millions (ppm) dans le sang et la peau de certains bélugas du St-Laurent seraient comparables à celles qui ont produit dans cette étude une augmentation significative de la fréquence de MN dans les fibroblastes de béluga.

Le poisson constitue la source majeure de contamination par le mercure pour les bélugas du St-Laurent (Hickie et al., 1991; Dalcourt et al., 1992). Le MeHg est la forme

prédominante du mercure retrouvée chez les poissons (Thompson, 1990). Malgré qu'une fraction du MeHg soit convertie en Hg dans le sang (IARC, 1993), presque tout le mercure dans le sang des mammifères, incluant les dauphins, est sous forme de MeHg (Itano et al., 1984; Vahter et al., 1994). Bien que les bélugas soient exposés surtout au MeHg, les formes de mercure inorganique et organique peuvent toutes les deux être génotoxiques (DeFlora et al., 1994). Par contre, dans cette étude l'induction de MN par le Hg était dix fois moins élevée que l'induction produite par le MeHg, ce qui est en accord avec le plus grand potentiel génotoxique du MeHg comparativement au Hg démontré dans plusieurs études (DeFlora et al., 1994).

Les concentrations les moins élevées de toxaphène, de chlordane et de p,p'-DDT ayant induit des augmentations significatives de MN en absence du mélange S9 étaient de 0.05, 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Les pesticides OCs n'ont pas été analysés dans le sang des bélugas. Cependant, des concentrations approximatives peuvent être estimées en tenant compte des différences observées dans la concentration de ces composés dans le contenu lipidique du sang et du gras. En effet, les OCs dans le sang et les autres tissus corporels atteignent un équilibre et, à cet équilibre, les concentrations dans les tissus sont principalement régies par leur contenu lipidique (Clark et al., 1987; Boon et al., 1994). La moyenne du contenu lipidique du gras des bélugas du St-Laurent est d'environ 85% (57-96%), ce qui est semblable à celle retrouvée chez d'autres espèces de cétacés à dents (Tanabe et al., 1981; Boon et al., 1994; Muir et al., 1996). Le contenu lipidique du sang chez les cétacés à dents a été estimé à environ 0.1% (0.05-0.32%) (Tanabe et al., 1981; Boon et al., 1994). Les concentrations dans le gras de toxaphène, de chlordane et de p,p'-

DDT chez les bélugas du St-Laurent (n=36) varient respectivement de 2 à 46, de 1 à 28, et de 3 à 389 $\mu\text{g/g}$ de poids lipidique (Martineau et al., 1987; Muir et al., 1996), ce qui correspond respectivement à des concentrations approximatives entre 0.002 et 0.05, 0.001 et 0.03, et 0.003 et 0.4 $\mu\text{g/g}$ de poids frais dans le sang. Sur une base en ppm, seulement la concentration de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de toxaphène utilisée dans la présente étude pourrait se situer à l'intérieur de la gamme des concentrations retrouvées dans le sang circulant de certaines de ces baleines. Des conclusions similaires sont atteintes lorsque les concentrations dans le sang sont estimées en utilisant un contenu lipidique sanguin de 0.32%. Néanmoins, les effets induits par le toxaphène n'étant plus observés en présence du mélange S9, ceci pourrait indiquer que le risque génotoxique *in vivo* de ce composé est faible aux concentrations retrouvées chez les bélugas du St-Laurent. Des concentrations entre 0.05 et 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de toxaphène devraient être testées pour définir la limite inférieure d'induction de MN en présence d'agent métabolique externe dans les fibroblastes de bélugas. De plus, des données plus complètes sur l'exposition et la distribution dans les différents tissus des formes inorganiques et méthylées du mercure et du toxaphène chez les bélugas de l'arctique et du St-Laurent seraient nécessaires afin de permettre des interprétations plus approfondies de ces données.

Des adduits de BP ont été retrouvés dans les tissus des bélugas du St-Laurent à des concentrations égales ou supérieures à celle retrouvées chez des animaux terrestres et aquatiques exposés dans des conditions contrôlées de laboratoire à une dose cancérigène de BP (Martineau et al., 1988; Pelletier et al., 1990; Martineau et al., 1994). L'analyse des contenus stomacaux a démontré que les bélugas du St-Laurent se nourrissent

d'organismes benthiques marins (Vladykov, 1946). Des observations de terrain suggèrent que les bélugas peuvent plonger jusqu'à des profondeurs de 350m pour se nourrir (Martin et Smith, 1992) et que les bélugas du St-Laurent creusent dans les sédiments du fond marin pour trouver leurs proies (Dalcourt et al., 1992; Michaud R., pers. comm.). Les HAPs ont été identifiés comme les contaminants les plus probables impliqués dans la génotoxicité des échantillons de sédiments de fond (e.g., Marvin et al., 1993; Gagné et al., 1995; Papoulias et Buckler, 1996). De plus, une relation significative a été trouvée entre les concentrations d'HAPs dans les sédiments du Fjord du Saguenay et la génotoxicité des extraits de tissus de bivalves de cette région (White et al., 1997). Ces données suggèrent que les bélugas du St-Laurent sont exposés aux HAPs liés aux sédiments et aux effets génotoxiques de ces composés. Les concentrations d'HAPs (somme de 13 à 16 HAPs non-substitués d'origine pyrogénique) dans les sédiments de surface des régions de l'estuaire du St-Laurent et du Fjord du Saguenay fréquentées par les bélugas varient respectivement entre 0.07 et 10 $\mu\text{g/g}$ et 0.2 et 30 $\mu\text{g/g}$ (poids sec) (Martel et al., 1986; Dalcourt et al., 1992; Gearing et al., 1994). Les concentrations de BP (0.5 et 2 $\mu\text{g/ml}$) et du mélange d'HAPs (5 et 20 $\mu\text{g/ml}$) qui ont induit des effets génotoxiques dans les fibroblastes de béluga dans cette étude sont à l'intérieur des limites des concentrations d'HAPs retrouvées dans les sédiments de surface de l'estuaire du St-Laurent et du Fjord du Saguenay. Cependant, des concentrations entre 0.1 et 5 $\mu\text{g/ml}$ du mélange d'HAPs devraient être testées afin de définir la limite inférieure d'induction de MN par ce mélange dans ces cellules.

L'induction *in vitro* de MN dans les fibroblastes de béluga par le MeHg, le toxaphène, et les HAPs à des concentrations rencontrées dans les tissus des bélugas du St-Laurent ou leur environnement n'indique toutefois pas nécessairement que ces composés soient impliqués dans l'étiologie du cancer chez cette population. En effet, les effets réels de ces composés sont certainement plus complexes pour les raisons suivantes: 1) seulement cinq HAPs ont été utilisés pour représenter le mélange d'HAPs présent dans l'habitat des bélugas du St-Laurent, alors que 16 composés ont été identifiés parmi ceux présents dans leur habitat (Dalcourt et al., 1992), 2) il n'y a pas d'association reconnue entre la génotoxicité et la carcinogénicité du MeHg et du toxaphène, 3) l'ampleur du phénomène de détoxification métabolique se produisant *in vivo* est inconnue et peut varier selon les composés, 4) la réparation du dommage à l'ADN et l'apoptose des cellules trop endommagées pourraient contribuer à diminuer l'activité génotoxique, 5) il peut exister des interactions de nature diverse entre les différents polluants environnementaux, modifiant leur potentiel génotoxique, 6) les fibroblastes d'un seul individu ont été utilisés dans cet ouvrage alors que les réponses observées pourraient varier selon les individus, et 7) une plus grande sensibilité des systèmes *in vitro* qu'*in vivo* est couramment observée.

Bien que les effets *in vitro* soient présumés être plus importants que les effets *in vivo*, des corrélations significatives ont été retrouvées entre la fréquence de MN et d'ACs et des concentrations de mercure dans le sang variant entre 0.01 et 1.1 $\mu\text{g/g}$ (poids frais) chez les humains et entre l'exposition à la pollution de l'air aux HAPs et la fréquence d'ACs et d'ECSs dans les lymphocytes du sang humain (Skerfving et al., 1974; Perera et al., 1992; Franchi et al., 1994). De plus, le MeHg, le toxaphène et plusieurs HAPs sont

considérés comme des carcinogènes chez les animaux expérimentaux et sont possiblement cancérigènes chez les humains (IARC, 1993). Ces composés ne peuvent donc pas être exclus comme participants possibles dans le procédé de carcinogénèse chez les bélugas du St-Laurent, particulièrement chez ceux qui ont des concentrations élevées de ces composés dans leurs tissus. Il faut aussi souligner que l'exposition à ces contaminants environnementaux pendant la longue vie des bélugas (~30 ans) pourrait entraîner une accumulation de lésions à l'ADN et une augmentation du risque de fixation des mutations et d'initiation du cancer.

Pour être utile à titre d'indicateur pour l'évaluation à long terme de la santé des populations de mammifères marins exposées à des contaminants environnementaux, la validation de l'approche cytogénétique doit se poursuivre directement chez les populations concernées. Tout d'abord, il s'agit de déterminer les fréquences de base des atteintes génotoxiques chez des populations peu exposées aux contaminants environnementaux et ceci fait l'objet du second volet de cet ouvrage. Cette évaluation de la fréquence des lésions à l'ADN chez des populations de mammifères marins peu exposées à la pollution environnementale permettra une comparaison future avec les valeurs retrouvées chez des individus de la même espèce mais appartenant à des populations fortement exposées.

7.2 Évaluation des niveaux de base d'atteintes cytogénétiques

À part les bélugas du St-Laurent, d'autres populations de mammifères marins, tels que les dauphins de Thétis de la Méditerranée, les dauphins à gros nez de la côte est des

États-Unis et les phoques gris de la mer de Baltique, ont montré des concentrations élevées de contaminants environnementaux dans leurs tissus qui ont été associées à certaines maladies chez ces populations (Baker et al., 1984; Kuehl et al., 1991; Aguilar et Borrell, 1994; Martineau et al., 1994; Olsson et al., 1994; Jenssen et al., 1996; Munson et al., 1998). Au contraire, les bélugas de l'arctique, les dauphins à gros nez de la baie de Sarasota, les phoques gris et les phoques du Groenland de l'Atlantique nord-ouest représentent des populations relativement peu exposées à la pollution environnementale. La mise au point des techniques de MN, d'ECS et d'AC comme biomarqueurs de génotoxicité et la détermination des taux de base de lésions chromosomiques a donc été effectué à partir des lymphocytes sanguins de représentants de ces populations peu exposées.

Les valeurs obtenues dans les lymphocytes de mammifères marins de cette étude ont été comparées avec les valeurs retrouvées dans la littérature pour les lymphocytes de mammifères terrestres en santé. Encore une fois, ces comparaisons doivent être faites avec précaution car les conditions de culture et les méthodologies varient selon les études. Les fréquences de CMNs et de MN totaux chez les mammifères marins de cette étude (2-14/1000 cellules BNs) se retrouvent dans les limites inférieures des valeurs observées pour les bovins (\bar{x} = 6.8-24.6, selon l'étude, étendue= 4 à 42) et les humains (\bar{x} = ~10, étendue= 1 à 80) (Scarfi et al., 1993; Fenech et al., 1994; Duffaud et al., 1997). La fréquence d'ECSs chez les bélugas (1-15 /cellule) se situe dans les limites inférieures des valeurs obtenues chez les bovins (\bar{x} = 4.8-6.4, étendue= 0-22), mais moins élevée que chez les chèvres (\bar{x} =6.6, étendue= 0-18), les moutons (\bar{x} =6.5 et 9.5), les humains (\bar{x} =8.3,

étendue= 1 à 21) et les buffles de rivière (\bar{x} =8.8) (Dunkelberg et Krames, 1984; Bender et al., 1988; Iannuzzi et al., 1988, 1991; Catalan et al., 1993; Di Meo et al., 1993; Gebel et al., 1996). Au contraire, les fréquences d'ACs totales excluant les brèches chez les bélugas (4-6 /100 cellules) sont plus élevées que ou dans les limites supérieures de celles observées chez d'autres mammifères terrestres (humains: \bar{x} = 0.08-4.5, étendue= 0 à 15, chevreuil: \bar{x} = 2.3, cochon: \bar{x} = 3.6, bovins: \bar{x} = 1.9 à 3.7), alors que les fréquences moyennes des brèches chez les bélugas se situent autour des limites médianes de celles retrouvées chez les humains (\bar{x} = 0.6, 4.3 et 8.1) (Galloway et al., 1986; Rubeš, 1987; Bender et al., 1988; Rubeš et al., 1992, 1997; Ganguly, 1993; King et al., 1994). Les valeurs de l'indice de prolifération après blocage de la cytokinèse chez les mammifères marins de cette étude (\bar{x} = 1.44) sont similaires à celles observées chez les bovins (\bar{x} = 1.46) (Scarfi et al., 1993), alors que celles de l'indice du taux de prolifération chez les bélugas (\bar{x} = 1.18) sont moins élevées que chez les bovins (\bar{x} = 1.82) et les moutons (\bar{x} = 1.40-1.58), et que les valeurs d'IM (\bar{x} = 0.79) sont plus basses que chez les humains (\bar{x} = 4.66, étendue= 1.05 à 9.87) (Dunkelberg et Krames, 1984; Catalan et al., 1993; Ganguly, 1993; Gebel et al., 1996).

Plusieurs facteurs, tels que l'espèce, le sexe, l'âge, le statut reproductif, l'état de santé général, les facteurs génétiques et la contamination environnementale peuvent constituer des variables importantes affectant les fréquences de dommages chromosomiques et la prolifération cellulaire dans les cellules humaines et animales (Carrano et Natarajan, 1988).

Des fréquences plus élevées de CMNs ont été retrouvées chez les dauphins femelles comparativement aux mâles. De telles différences ont été rapportées dans la

majorité des études réalisées chez les lymphocytes humains et ceci serait dû à l'implication préférentielle des chromosomes X dans l'aneuploïdie somatique chez les femelles (Fenech et al., 1994; Richard et al., 1994; Zijno et al., 1996). Une augmentation de la fréquence de CMNs reliée à l'âge a été observée chez les dauphins. Plusieurs études ont rapporté une augmentation dans la fréquence des lésions chromosomiques en fonction de l'âge chez les mammifères, qui pourrait être causée par l'accumulation de dommages à l'ADN, incluant la perte des chromosomes X chez les femelles, et/ou par la diminution de la compétence de réparation de l'ADN (Das et Sharma, 1983; Dunkelberg et Krames, 1984; Tice et Setlow, 1985; Ganguly, 1993; King et al., 1994; Richard et al., 1994; Zijno et al., 1996). Cependant d'autres études ont démontré l'absence de différence de la fréquence de dommage chromosomique selon le sexe, tel qu'observé chez les bélugas de cette étude (Bender et al., 1988; Heddle, 1990). Un effectif d'échantillonnage plus grand est nécessaire pour tester de façon plus approfondie cette hypothèse chez les bélugas. De façon similaire aux bélugas, la majorité des études chez les humains et les ongulés ont montré des fréquences d'ECSs spontanées légèrement, mais pas significativement, plus élevées (moyenne de 0.5 SCE/cellule) chez les femelles que les mâles (Carrano et Natarajan, 1988; Di Meo et al., 1993). Des fréquences plus élevées de CMNs, mais pas d'ECSs et d'ACs, ont été observées chez le béluga Mauyak à 12.5 mois de gestation. Il a déjà été observé que les lymphocytes de femmes et de muntjacs de l'Inde ont des fréquences plus élevées d'ECSs et d'ACs induites par les rayons X à la fin de leur gestation, et ceci a été expliqué par l'altération des fonctions hormonales et physiologiques pendant la gestation (Sharma et Das, 1986). Des troubles de santé ont été

retrouvés chez quatre des dauphins à gros nez mais les fréquences de MN et les valeurs d'indice de prolifération après blocage de la cytokinèse étaient similaires à celles des autres dauphins. Contrairement aux observations faites chez d'autres espèces de mammifères, une réduction de la prolifération des lymphocytes reliée à l'âge n'a pas été observée chez les bélugas et les dauphins de cette étude (Das et Sharma, 1983; Dunkelberg et Krames, 1984; Tice et Setlow, 1985; Ganguly, 1993). Cependant l'âge des animaux étudiés ne s'étendait que de 2 à 20 ans. Il serait nécessaire de vérifier cette relation sur une étendue d'âge plus large et avec un effectif plus grand chez ces cétacés.

Des études ont démontré des fréquences de MN et de ACs statistiquement plus élevées dans des populations humaines, d'ongulés, de poissons et d'invertébrés exposées à des concentrations élevées d'HAPs, d'OCs et/ou de métaux lourds comparativement à des populations peu exposées à ces composés (Skerfving et al., 1974; Rubeš, 1987; De Flora et al., 1991; Perera et al., 1992; Rubeš et al., 1992, 1997; Franchi et al., 1994, AlSabti et Metcalfe, 1995). L'absence de différences interspécifiques dans les fréquences de MN entre les bélugas, les dauphins et les phoques pourrait être causée par plusieurs facteurs, tels qu'une exposition similaire aux contaminants environnementaux génotoxiques possiblement présents dans leurs environnement et/ou la similarité de l'étendue d'âge et de la proportion d'individus de chaque sexe. Les populations de bélugas de l'arctique de l'ouest de la baie d'Hudson, de phoques du nord-ouest de l'Atlantique et de dauphins à gros nez de la baie de Sarasota sont considérées en santé et sont exposées à des concentrations relativement faibles de contaminants environnementaux (Muir et al., 1990; Béland et al., 1992; Vedder et al., 1993). Quoique certains phoques gris vivant en liberté

ont des concentrations relativement élevées de certains composés chimiques dans leurs tissus (Béland et al., 1992), des concentrations faibles sont attendues chez des animaux nés ou vivants en captivité depuis plusieurs années. Les bélugas et les phoques captifs utilisés dans cette étude sont nourris d'une diète similaire, surtout composée de harengs provenant du nord de l'Atlantique et du nord du Pacifique qui sont considérés avoir des niveaux semblables de contamination environnementale. Les valeurs différentes de l'indice de prolifération après blocage de la cytokinèse chez les bélugas comparativement aux dauphins à gros nez et aux phoques gris pourraient être expliquées par des différences interspécifiques dans la cinétique du cycle cellulaire, tel qu'observé pour d'autres espèces de mammifères (Leonard et al., 1982; Rubeš et al., 1992).

Les fréquences d'ECSs chez les bélugas étaient similaires à celles observées dans les lymphocytes de bébés phoques gris et de phoques annelés adultes de la mer de Baltique (\bar{x} = 4.5, étendue = 0-14) (Hongell, 1996). Les fréquences totales d'ACs excluant les brèches chez les bélugas étaient similaires à celles retrouvées chez les bébés phoques gris de la mer de Baltique (\bar{x} = 3.3-7.7, dépendant de l'année d'échantillonnage, étendue = 0 à 21), mais plus élevées que celles des phoques annelés adultes de la mer de Baltique (\bar{x} = 2.2, étendue = 0 à 3) (Hongell, 1996). En raison des concentrations plus élevées de contaminants environnementaux chez les phoques de la mer de Baltique que chez les bélugas de l'arctique (Muir et al., 1990; Olsson et al., 1994), des fréquences moins élevées d'ECSs et d'ACs étaient attendues chez les bélugas de l'arctique. Cependant, contrairement aux bélugas de l'arctique, des métaphases contenant des ACs multiples, des fragmentations multiples des chromosomes et des ACs plus rares et plus complexes, tels

que des tétrades, ont été retrouvées chez les phoques de la mer de Baltique (Hongell, 1996). La présence de tétrades sont considérés très rares et s'observent plus couramment chez les humains qui souffrent de cancer et/ou sont exposés à des agents génotoxiques (Aurias, 1993; De Ferrari et al., 1993). En outre, des différences dans les conditions de culture et de méthodologies et des différences interspécifiques dans le bagage génétique, dans les proportions des sexes et dans l'étendue d'âge pourraient aussi contribuer aux différences dans les valeurs d'ECSs et d'ACs observées entre l'étude de Hongell (1993) et cette étude (Carrano et Natarajan, 1988).

Les techniques d'analyse des MN, des ECSs et/ou des ACs ont été développés et appliqués avec succès comme biomarqueurs de génotoxicité dans les lymphocytes de bélugas, de dauphins à gros nez, de phoques gris et de phoques du Groenland. Une étude subséquente réalisée chez des populations exposées permettrait de vérifier s'il y a accroissement des fréquences d'atteintes génotoxiques en lien avec une exposition environnementale. Malgré la plus grande rapidité et facilité de l'analyse des MN, les trois tests devraient être utilisés de façon complémentaire car ils analysent des types différents de dommage à l'ADN qui pourraient avoir des sensibilités différentes aux contaminants environnementaux.

CONCLUSION

Puisque l'augmentation de la fréquence de dommages chromosomiques dans les lymphocytes du sang périphérique pourrait refléter un risque de cancer, de tératogenèse et d'autres maladies (Carrano et Natarajan, 1988; Nordic Study Group, 1990; De Ferrari et al., 1991; Duffaud et al., 1997), l'évaluation des MN, des ECSs et des ACs pourraient être utilisés pour l'évaluation à long terme de la santé des populations de mammifères marins. Les deux volets de cet ouvrage représentent les étapes initiales de la validation de l'approche cytogénétique pour la mise en évidence d'une exposition génotoxique chez les mammifères marins. Dans un premier temps, cette approche a permis l'évaluation du potentiel génotoxique de certains contaminants environnementaux retrouvés à des concentrations relativement élevées chez les bélugas du St-Laurent et d'autres populations de mammifères marins. Dans un deuxième temps, l'évaluation du niveau de base d'atteintes génotoxiques retrouvées *in vivo* chez des bélugas et d'autres mammifères marins peu exposés à la pollution environnementale a été réalisée. La dernière étape de validation de cette approche consistera à déterminer et à mettre en relation la fréquence des dommages à l'ADN et les concentrations des principaux contaminants étudiés précédemment, soit MeHg, toxaphène et adduits de BP, dans le sang de populations de bélugas et d'autres espèces de mammifères marins retrouvées dans des environnements pollués. Par exemple, ceci rendrait possible la comparaison des fréquences d'atteintes génotoxiques entre les bélugas de l'arctique et les bélugas du St-Laurent, population fortement exposée aux contaminants environnementaux et chez laquelle une incidence élevée de cancer est retrouvée. Malgré des efforts soutenus, il a été impossible de

capturer et d'échantillonner le sang des bélugas du St-Laurent à l'intérieur de la période de temps consacré à cet ouvrage.

D'autres études devront aussi être effectuées afin de déterminer le potentiel génotoxique dans les fibroblastes et/ou les lymphocytes de bélugas de d'autres polluants reconnus ou suspectés d'être génotoxiques ainsi que d'autres mélanges de contaminants. D'autres méthodes pourraient aussi être appliquées afin de mieux caractériser le potentiel génotoxique des contaminants. Par exemple, la mise au point de l'essai Comet, qui évalue les lésions simples et doubles brins à l'ADN, est présentement en cours dans les lymphocytes de bélugas. Ces différents essais permettront d'analyser plusieurs types différents de dommage à l'ADN qui, dans certains cas, peuvent avoir des sensibilités différentes aux contaminants environnementaux. Les études futures de MN pourraient inclure l'utilisation d'un anticorps anti-kinétochore (méthode d'immunofluorescence) ou de sondes spécifiques pour la région centromérique (méthode d'hybridation *in situ* à fluorescence - FISH) utilisés pour distinguer entre les MN contenant des fragments chromosomiques et des chromosomes entiers (Hennig et al., 1988; Bonatti et al., 1992; Schuler et al., 1997), afin d'élucider les mécanismes de formation des MN dans les cellules de bélugas. Ces analyses futures permettront aussi des investigations plus approfondies des interactions (effets synergiques, additifs et/ou antagonistes) entre les composés retrouvés dans les mélanges de contaminants environnementaux auxquels sont exposés les bélugas du St-Laurent et d'autres espèces de mammifères marins.

Pour conclure, les techniques de MN, d'ECS et d'AC pourraient être utilisés comme biomarqueurs de génotoxicité pour comparer le niveau de dommage à l'ADN chez

des populations de mammifères marins relativement non-exposées et très exposées aux polluants environnementaux. Cependant, un plus grand effectif sera nécessaire afin de confirmer les niveaux de base d'atteintes génotoxiques chez les populations peu exposées et de mettre en relation une augmentation de fréquences de ces atteintes avec les niveaux de contamination retrouvés dans les tissus ou l'environnement des populations à l'étude. La difficulté d'obtenir des échantillons chez les mammifères marins est une limitation importante dans la réalisation d'une telle étude. D'une part, ces espèces sont protégées ce qui rend difficile toute approche. D'autre part, lorsqu'un protocole d'obtention d'échantillons est accepté par les autorités concernées, encore faut-il que les animaux soient présents en nombre suffisant et qu'il soit possible de les capturer. Le programme annuel de capture et de relâche des dauphins à gros nez de la baie de Sarasota est utilisé pour recueillir des données sur l'état de santé et de contamination de cette population et représente une opportunité idéale pour augmenter nos connaissances sur les dommages à l'ADN chez un grand effectif d'une population bien connue de mammifères marins. L'analyse des OCs et de certains métaux lourds chez ces animaux pourrait être utilisé comme un index général de contamination pour l'analyse de l'association possible entre la contamination chimique et les lésions à l'ADN chez les dauphins à gros nez et d'autres espèces de mammifères marins. L'analyse des biomarqueurs de génotoxicité ainsi que d'autres paramètres de santé en parallèle avec celle des contaminants environnementaux dans le sang de mammifères marins pourrait être utilisée dans l'avenir comme approche approfondie et non destructive pour prédire l'impact de la pollution sur ces animaux.

RÉFÉRENCES

Aguilar, A. et A. Borrell. 1994. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci. Tot. Environ.* 154: 237-247.

Agriculture Canada. 1990. Canadian Association of Pesticide Control Officials, note 90-02. *Directorat des pesticides, Agriculture Canada, Ottawa, ON.*

Ahmed, F. E., R. W. Hart et N. J. Lewis. 1977. Pesticide induced DNA damage and its repair in cultured human cells. *Mutation Res.* 42: 161-174.

Allen, A. L., L. D. Koller et G. A. Pollock. 1983. Effect of toxaphene exposure on immune responses in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 11: 61-69.

Al-Sabti, K. et C. D. Metcalfe. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.* 343: 121-135.

Andersen, O., M. Rønne et G. F. Nordberg. 1983. Effects of inorganic metal salts on chromosome length in human chromosomes. *Hereditas* 98: 65-70.

André, J. M., F. Ribeyre et A. Boudou. 1990. Mercury contamination levels and distribution in tissues and organs of Delphinids (*Stenella attenuata*) from the eastern tropical Pacific, in

relation to biological and ecological factors. *Mar. Environ. Res.* 30: 43-72.

Ashby, J. et R. W. Tennant. 1991. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. *Mutation Res.* 257: 229-306.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological profile for benzo[*a*]pyrene. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Aurias, A. 1993. Acquired chromosomal aberrations in normal individuals. Dans: *The Causes and Consequences of Chromosomal Aberrations*, I. R. Kirsch (éditeur), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 125-139.

Bailey, R. et N. Zinger. 1995. Plan de rétablissement du béluga du St-Laurent. World Wildlife Fund, Toronto, et le Département des Pêches et Océans, Mont-Joli. 73pp.

Baird, R. W., E. L. Walters et P. J. Stacey. 1993. Status of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, with special reference to Canada. *Can. Field Naturalist* 107: 466-480.

Baker, J. R. 1984. Mortality and morbidity in grey seal pups (*Halichoerus grypus*). Studies on its causes, effects of environment, the nature and sources of infectious agents and the

- immunological status of pups. *J. Zool. Lond.* 203: 23-48.
- Baker, S. R., C. Barette et M. O. Hamill. 1995. Mass transfer during lactation of an ice-breeding pinniped, the grey seal (*Halichoerus grypus*), in Nova Scotia. *J. Zool. (London)* 236: 531-542.
- Bakir, F., S. F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, N. Y. Al-Rawi, S. Tikriti, H. I. Dhahir, T. W. Clarkson, J. C. Smith et R. A. Douherty. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq: an interuniversity report. *Science* 181: 230-241.
- Barlovatz-Meimon, G. et I. Martelly. 1988. Culture de fibroblastes. Dans: *Culture de cellules animales: methodologie d'applications*, M. Adolphe et G. Barlovatz-Meimon (éditeurs), Éditions INSERM, Paris, pp. 141-167.
- Baret, A. et I. Emerit. 1983. Variation of superoxide dismutase levels in fetal calf serum. *Mutation Res.* 121: 293-297.
- Banerjee, B. D. 1987. Effects of subchronic DDT exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 827-834.
- Banerjee, R., A. K. Giri, A. Sharma et G. Talukder. 1986. Chromosomal and cellular changes induced by organochlorine and cabaryl compounds. *Perspect. Cytol. Genet.* 3: 403-

406.

Barros, N. B. et D. K. Odell. 1990. Food habits of bottlenose dolphins in the southeastern United States. Dans: *The bottlenose dolphin*, S. Leatherwood et R. R. Reeves (éditeurs), Academic Press, San Diego, CA, pp. 309-328.

Bateman, G. 1984. *All the world's animals: sea mammals*. G. Bateman, P. Forbes, B. MacKeith et R. Perberdy (éditeurs), Torstar Books, NY, NY. 158pp.

Beck, G. G., M. O. Hamill et T. G. Smith. 1993. Seasonal variation in the diet of harp seals (*Phoca groenlandicus*) from the gulf of St. Lawrence and western Hudson Strait. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1363-1371.

Béland, P., A. Vézina et D. Martineau. 1988. Potentiel for growth of the St. Lawrence population (Québec, Canada) beluga whale (*Delphinapterus leucas*) population based on modelling. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 45: 22-32.

Béland, P., S. DeGuise et R. Plante. 1992. Toxicology and pathology of St. Lawrence marine mammals. Final report for the World Wildlife Fund's Wildlife Toxicology Fund. 95pp.

Béland, P., S. DeGuise, C. Girard, A. Lagacé, D. Martineau, R. Michaud, D. C. G. Muir, R.

J. Norstrom, É. Pelletier, S. Ray et L. R. Shugart. 1993. Toxic compounds and health and reproductive effects in St. Lawrence beluga whales. *J. Great Lakes Res.* 19: 766-775.

Bender, M. A., H. G. Griggs et J. S. Bedford. 1974. Recombinational DNA repair and sister chromatid exchanges. *Mutation Res.* 24: 117-123.

Bender, M. A., R. J. Preston, R. C. Leonard, B. E. Pyatt, P. C. Gooch et M. D. Shelby. 1988. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutation Res.* 204: 421-433.

Betti, C., T. Davini et R. Barale. 1992. Genotoxic activity of methylmercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. *Mutation Res* 281: 255-260.

Betti, C. et M. Negro. 1996. The Comet assay for the evaluation of the genetic hazard of pollutants in cetaceans: preliminary results on the genotoxic effects of methyl-mercury on the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) lymphocytes *in vitro*. *Mar. Pollut. Bull.* 32: 545-548.

Bhunya, S. P. et G. B. Jena. 1992. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an *in vivo* study in chicks. *Mutation Res.* 272: 175-181.

Bidleman T. F., G. W. Patton, M. D. Walla, B. T. Hardgrave, W. P. Vass, P. Erickson, B.

- Fowler, V. Scott et D. J. Gregor. 1989. Toxaphene and other organochlorines in arctic ocean fauna: evidence for atmospheric delivery. *Arctic* 42: 307-313.
- Boffeta, P., E. Merler et H. Vainio. 1993. Carcinogenicity of mercury and mercury compounds: a review. *Scand. J. Work Environ. Health* 19: 1-17.
- Bonatti, S., Z. Cavalieri, S. Vviaggi, et A. Abbondandolo. 1992. The analysis of 10 potential spindle poisons for their ability to induce CREST-positive micronuclei in human diploid fibroblasts. *Mutagenesis* 7: 111-114.
- Boon, J. P., I. Oostingh, J. van der Meer et T. J. Hillebrand. 1994. A model for the accumulation of chlorobiphenyl congeners in marine mammals. *Eur. J. Pharmacol.* 270: 237-251.
- Borgaonkar, D. S. 1993. Chromosomal variation in man: a catalog of chromosomal variants and anomalies. Septième édition, Alan S. Liss, NY, NY.
- Bowen, W. D., J. W. Lawson et B. Beck. 1993. Seasonal and geographic variation in the species composition and size of prey consumed by grey seals (*Halichoerus grypus*) on the Scotian Shelf. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1768-1778.
- Breton-Provencher, M. 1982. Les bélugas du St-Laurent. Publié par la Société linéenne du

- Québec. Pêches et Océans, gouvernement du Canada, Ottawa, 30 pp.
- Brewen, J. G. et D. G. Stetka. 1982. Cytogenetic events *in vivo*. Dans: Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology, J. A. Heddle (éditeur), Academic Press, NY, NY, pp. 351-384.
- Brodie, P. F. 1971. A reconsideration of aspects growth, reproduction, and behavior of the white whale (*Delphinapterus leucas*), with reference to the Cumberland Sound, Baffin Island population. J. Fish. Res. Board Can. 28: 1309-1318.
- Brodie, P. F. 1989. The white whale, *Delphinapterus leucas*, (Pallas, 1776). Dans: Handbook on marine mammals, volume 4, Academic Press, Londres, pp. 119-144.
- Brogger, A. 1982. The chromatid gap - a useful parameter in genotoxicology? Cytogenet. Cell. Genet. 33: 14-19.
- Buckton, K. E., G. E. Hamilton, L. Paton, et A. O. Langlands. 1978. Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients. Dans: Mutagen-induced chromosome damage in man, H. J. Evans et D. C. Lloyd (éditeurs), Edinburg University Press, Eidenburg, pp. 142-150.
- Burchiel, S. W. 1996. Immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Crisp Data

Base of the National Institute of Health, 97-ES05495-05.

Burns, J. J. et G. A. Seaman. 1985. Investigations of belukha whales in coastal waters of western and northern Alaska. II. Biology and ecology. Rep. Alaska Dept. Fish Game, Fairbanks, Alaska, NA81 RAC 00049, NTIS. 129 pp.

Byczkowski, J. Z. 1977. Biochemical and ultrastructural changes in biological membranes induced by p,p'-DDT (chlorophenotatum) and its metabolites. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 29: 411-417.

Cairns, J. 1975. Mutation selection and the natural history of cancer. Nature 255: 197-200.

Canonero, R., G. Brambilla Campart, F. Mattioli, L. Robbiano et A. Martelli. 1997. Testing of *p*-dichrolobenzene and hexachlorobenzene for their ability to induce DNA damage and micronucleus formation in primary cultures of rat and human hepatocytes. Mutagenesis 12: 35-39.

Cantoni, O. et Costa M. 1983. Correlations of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury(II) and X-rays. Mol. Pharmacol. 24: 84-89.

Cantoni, O., N. T. Christie, A. Swann, D. B. Drath et M. Costa. 1984. Mechanism of HgCl₂ cytotoxicity in cultured mammalian cells. Molec. Pharmacol. 26: 360-368.

- Cappon, C. J. et J. C. Smith. 1982. Chemical form and distribution of mercury and selenium in edible seafood. *J. Anal. Toxicol.* 6: 10-21.
- Caron, L. M. J. et T. G. Smith. 1990. Philopatry and site tenacity of belugas, *Delphinapterus leucas*, hunted by the Inuit at the Nastapoka estuary, eastern Hudson Bay. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 224: 69-79.
- Carrano, A. V. 1982. Sister chromatid exchange as an indicator of human exposure. Dans: Indicators of genotoxic exposure, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, NY, pp. 307-318.
- Carrano, A. V. et D. H. Moore. 1982. The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in humans. Dans: Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology, J. A. Heddle (éditeur), Academic Press, NY, NY, pp.267-304.
- Carrano, A. V. et A. T. Natarajan. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.* 204: 379-406.
- Catalan, J., C. Moreno et M. V. Arruga. 1993. Sister-chromatid exchanges induced by chloramphenicol on bovine lymphocytes. *Mutation Res.* 319: 11-18.
- Celotti, L., P. Ferraro, D. Furlan, N. Zanesi et S. Pavanello. 1993. DNA repair in human

- lymphocytes treated *in vitro* with (±)-anti- and (±)-syn-benzo[*a*]pyrene diolepoxide. *Mutation Res.* 294: 117-126.
- Chandurkar, P. et F. Matsumura. 1979. Metabolism of toxaphene components in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8: 1-24.
- Cheng, M., M. K. Konner et Y. Alarie. 1981. Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities. *Cancer Res.* 41: 4489-4492.
- Clark, T. P., R. J. Norstrom, G. A. Fox et H. T. Won. 1987. Dynamics of organochlorine compounds in herring gulls (*Larus argentus*): II. A two-compartment model and data for ten compounds. *Environ. Contam. Toxicol.* 6: 547-559.
- Cleaver, J. E., D. L. Mitchell. L. Feeney et V. Afzal. 1996. Chromatid exchanges may be induced by damage sites of transcriptional activity. *Mutagenesis* 11: 183-187.
- Colborn, T., F. S. von Saal, and A. M. Soto. 1993. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378-384.
- Cossa, D. 1990. Chemical contamination in the St. Lawrence estuary and Saguenay Fjord. Dans: *Coastal and Estuarine Studies, Oceanography of a Large-Scale Estuarine System,*

- volume 39, M. I. El-Sabh and N. Silverberg (éditeurs), pp. 239-268.
- Couillard D. 1982. Evaluation des teneurs en composés organochlorés dans le fleuve, l'estuaire et le golfe Saint-Laurent, Canada. *Environ. Poll. Ser. B* 3: 239-270.
- Countryman, P. I. et J. A. Heddle. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Res.* 41: 321-332.
- Crofton-Sleigh, C., A. Doherty, S. Ellard, E. M. Parry et S. Venitt. 1993. Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydroxylase. *Mutagenesis* 8: 363-372.
- Crosby, D. G. 1969. The nonmetabolic decomposition of pesticides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 160: 82-96.
- Culp, S. J. et F. A. Beland. 1994. Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo[*a*]pyrene. *Carcinogenesis* 15: 247-252.
- Dalcourt, M.-F., P. Béland, É. Pelletier et Y. Vigneault. 1992. Caractérisation des communautés benthiques et étude des contaminants dans les aires fréquentées par le béluga du St. Laurent. *Rapp. Tech. Can. Sci. Halieut. Aquat.* 1845: 86 pp.

- Das, B. C. et T. Sharma. 1983. Influence of age on the frequency of sister chromatid exchanges and X-ray-induced chromosome aberrations in muntjac. *Mutation Res.* 109: 53-63.
- DeFerrari, M., M. Artuso, S. Bonassi, S. Bonatti, Z. Cavalieri, D. Pescatore, E. Marchini, V. Pisano et A. Abbondandolo. 1991. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. *Mutation Res.* 260: 105-113.
- DeFlora, S., M. Bagnasco et P. Zanicchi. 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Res.* 258: 285-320.
- DeFlora, S., C. Bennicelli et M. Bagnasco. 1994. Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutation Res.* 317: 57-79.
- DeGuise, S., A. Lagacé et P. Béland. 1994. Tumors in St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Vet. Pathol.* 31: 444-449.
- DeGuise, S., D. Martineau, P. Béland et M. Fournier. 1995. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 4): 73-77.

- DeGuise, S., J. Bernier, M. M. Dufresne, D. Martineau, P. Béland et M. Fournier. 1996. Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): evaluation of mitogen-induced blastic transformation of lymphocytes from peripheral blood, spleen and thymus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 50: 117-126.
- DePierre, J. W. et L. Ernster. 1978. The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 473: 149-186.
- Dillehay, L. E., D. Jacobson-Kram et J. R. Williams. 1989. DNA topoisomerases and models of sister chromatid exchange. *Mutation Res.* 215: 15-23.
- Di Meo, G. P., L. Iannuzzi, A. Perucatti, L. Ferrara, M. Pizzillo et R. Rubino. 1993. Sister chromatid exchange in the goat (*Capra hircus*). *Hereditas* 118: 35-38.
- Drouin, R., P.-É. Messier et C.-L. Richer. 1989. DNA denaturation for ultrastructural banding and the mechanism underlying the fluorochrome-photolysis-Giemsa technique studied with anti-5-bromodeoxyuridine antibodies. *Chromosoma* 98: 174-180.
- Duffaud, F., T. Osière, P. Villani, A. L. Pelissier, F. Volot, R. Favre et A. Botta. 1997. Comparisons between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis* 12: 227-231.

- Dunkelberg, H. et J. Krames. 1984. Sister-chromatid exchange in cultures lymphocytes of ewes and their newborn lambs. *Mutation Res.* 140: 117-121.
- Edelman, G. M., B. A. Cunningham, G. N. Jr. Reeke, J. W. Becker, J. W. Waxdal et J. L. Wang. 1972. The covalent and three-dimensional structure of concavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2580-2584.
- Eichhorn, G. L. 1981. The effect of metal ions on the structure and function of nucleic acids. Dans: *Advances in inorganic biochemistry*, volume 3, G. L. Eichhorn et G. Marzilli (éditeurs), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 1-46.
- Ellard, S., Y. Mohammed, S. Dogra, C. Wölfel, J. Doehmer et J. M. Parry. 1991. The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver *CYP1A1*, *IA2* and *2B1* cDNAs in micronucleus assays. *Mutagenesis* 6: 461-470.
- Evans, H. J. 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Dans: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, deuxième édition, B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols et C. Ramel (éditeurs), Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427.
- Evans, H. J. 1988. Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutation Res.* 204: 355-363.

- Evans, H. J. 1990. Cytogenetics. Dans: *Mutation in the Environment. Part B*, M. L. Mendelsohn and R. J. Albertini (éditeurs), Wiley-Liss, Inc., NY, NY, pp. 301-323.
- Fellin, P., L. A. Barrie, D. Dougherty, D. Toom, D. Muir, N. Grift, L. Lockhart et B. Billeck. 1996. Air monitoring in the arctic: results for selected persistent organic pollutants for 1992. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 253-261.
- Fenech, M. et A. A. Morley. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 147: 29-36.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxic studies in human populations. *Mutation Res.* 285: 35-44.
- Fenech, M., S. Neville et J. Rinaldi. 1994. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Res.* 313: 203-207.
- Fenech, M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Res.* 392: 11-18.
- Franchi, E., G. Loprieno, M. Ballardini, L. Pirozzi et L. Migliore. 1994. Cytogenetic

- monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutation Res.* 320: 23-29.
- Fries, G. F. 1995. Transport of organic environmental contaminants to animal products. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 141: 71-109.
- Gagné, F., S. Trottier, C. Blaise, J. Sproull et B. Ernst. 1995. Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 78: 175-182.
- Galloway, S. M., P. K. Berry, W. W. Nichols, S. R. Wolman, K. A. Soper, P. D. Stolley et P. Archer. 1986. Chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to ethylene oxide, and in a large control population. *Mutation Res.* 170: 55-74.
- Ganguly, B. B. 1993. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. *Mutation Res.* 295: 135-148.
- Gauthier, J. M., H. Dubeau et E. Rassart. (Sous presse et chapitre 3 de cette thèse). Mercury induced micronuclei in skin fibroblasts of beluga whales. *Environ. Toxicol. Chem.*
- Gauthier, J. M., H. Dubeau et E. Rassart. (Sous presse et chapitre 4 de cette thèse). Micronuclei induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in isolated beluga whale skin

- fibroblasts. Dans: Cell and molecular biology of marine mammals, C. Pfeiffer (éditeur), Krieger Publishing Co. Melbourne, FL.
- Gearing, J. N., P. J. Gearing, M. Noël et J. N. Smith. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment of the St. Lawrence estuary. Comptes rendus du vingtième colloque annuel de toxicologie aquatique, 17-21 octobre 1993, Québec. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1989: 58-64.
- Gebel, T. S. Kevekordes, J. Schaefer, H. von Platen et H. Dunkelberg. 1996. Assessment of a possible genotoxic environmental risk in sheep bred on grounds with strongly elevated contents of mercury, arsenic and antimony. Mutation Res. 368: 267-274.
- Germain, D. et A. Bernheim. 1983. Les syndromes d'instabilité chromosomique. Annales de génétique, Sem. Hop. Paris, pp. 3065-3079.
- German, J. 1972. Genes which increase chromosomal instability in somatic cells and predispose to cancer. Prog. Med. Genet. 8: 61-101.
- Gilbert, M. M., J. Sprecher, L. W. Chang et L. F. Meisner. 1983. Protective effect of vitamin E on genotoxicity of methylmercury. J. Toxicol. Environ. Health 12: 767-773.
- Glover, T. W. et C. K. Stein. 1987. Induction of sister chromatid exchanges at common

- fragile sites. *Am. J. Hum. Genet.* 41: 882-890.
- Gobeil, C et Cossa D. 1993. Mercury in sediments and sediment pore water in the Laurentian trough. *Can. J. Aquat. Sci.* 50: 1794-1800.
- Grant, W. F. 1973. Cytological effects of environmental mutagens - pesticides. *Mutation Res.* 21: 221-222.
- Gulland, F. M. D., J. G. Trupkiewicz, T. R. Spraker et L. J. Lowenstine. 1996. Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *J. Wildl. Disease* 32: 250-258.
- Hadina, P. D., R. L. Singhal and G. M. Ling. 1975. DDT and related hydrocarbon insecticides: Pharmacological basis of their toxicity in mammals. *Adv. Pharm. Chemother* 12: 31-88.
- Hamill, M. O. et J.-F. Gosselin. 1995. Reproductive rates, age of maturity and age at first birth in northwest Atlantic grey seals (*Halichoerus grypus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 2757-2761.
- Hamill, M. O., M. C. S. Kingsley, G. G. Beck et T. G. Smith. 1995. Growth and condition in the northwest Atlantic harp seal. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 478-488.

- Hamill, M. O., G. B. Stenson, R. A. Myers et W. T. Stobo. 1998. Pup production and population trends of the grey seal (*Halichoerus grypus*) in the gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 55: 423-430.
- Hansen, L. J. et R. S. Wells. 1995. Bottlenose dolphin health and environmental risk assessment. Présenté à la onzième conférence biannuelle sur la biologie des mammifères marins, Orlando, FL, 14-18 décembre 1995.
- Hargrave, B. T., W. P. Bass, P. E. Erickson and B. R. Fowler. 1989. Distribution of chlorinated hydrocarbon pesticides and PCBs in the arctic ocean. *Can. Techn. Rep. Aquat. Sci.* no. 1644. 115pp.
- Hart, M. M., J. Whang-Peng, S. M. Sieber, S. Fabro et R. H. Adamson. 1972. Distribution and effect of DDT in the pregnant rabbit. *Xenobiotica* 2: 567-574.
- Harvey, R. G. 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons, chemistry and carcinogenicity. Cambridge University Press, Cambridge, 396pp.
- Haugen, D. A. et M. J. Peak. 1983. Mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit mutagenesis in the Salmonella/microsome assay by inhibition of metabolic activation. *Mutation Res.* 116: 257-269.

He, S. L. et R. Baker. 1991. Micronuclei in mouse skin cells following *in vivo* exposure to benzo[*a*]pyrene, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene, chrysene, pyrene and urethane. *Environ. Molec. Mutagen.* 17: 163-168.

Heddle, J. A., C. B. Lue, E. F. Saunders et R. D. Benz. 1978. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res.* 38: 2983-2988.

Heddle, J. A. 1990. Micronuclei '*in vivo*'. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340: 185-194.

Heddle, J. A., M. C. Cimino, M. Hayashi, F. Roamgna, M. D. Shelby, J. D. Tucker, Ph. Vanparys et J. T. MacGregor. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Molec. Mutagen.* 18: 277-291.

Hellou, J., G. Stenson, I.-H. NI et J. F. Payne. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in muscle tissue of marine mammals from the northwest Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 21: 469-473.

Hemminki K et P. Vineis. 1985. Extrapolation of the evidence on teratogenicity of chemicals between humans and experimental animals: chemicals other than drugs. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 5: 251-318.

Hennig, U. G. G., N. L. Rudd et D. I. Hoar. 1988. Kinetochores immunofluorescence in

- micronuclei: a rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. *Mutation Res.* 203: 405-414.
- Hickie, B. E., D. Mackay, P. Béland et P. V. Hodson. 1991. Modelling contaminant accumulation in the St. Lawrence beluga. Présenté à la vingtième réunion annuelle de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Seattle, WA, 3-7 novembre 1991.
- Hohn, A. A. 1980. Age determination and age related factors in the teeth of western North Atlantic bottlenose dolphins. *Sci. Rep. Whale Res. Instit.* 32: 39-66.
- Hollstein, M., J. McCann, F. A. Angelosanto et W. W. Nichols. 1979. Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Res.* 65: 133-226.
- Hongell, K. 1996. Chromosome survey of seals in the Baltic Sea in 1988-1992. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 399-403.
- Hooper, N. K., B. N. Ames, M. A. Saleh et J. E. Casida. 1979. Toxaphene, a complex mixture of polychloroterpenes and a major insecticide, is mutagenic. *Science* 205: 591-592.
- Hopkins, J. M. et H. J. Evans. 1980. Cigarette-smoke induced DNA damage and lung cancer risks. *Nature* 283: 388-390.

Iannuzzi, L., A. Perucatti, G. P. Di Meo et L. Ferrara. 1988. Sister chromatid exchange in chromosomes of river buffalo (*Bubalus Bubalis* L.). *Caryologia* 41: 237-244.

Iannuzzi, L., G. P. Di Meo, A. Perucatti, L. Ferrara et I. Gustavsson. 1991. Sister chromatid exchange in chromosomes of cattle from three different breeds reared under similar conditions. *Hereditas* 114: 201-205.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, volume 32, Lyon, pp. 39-91.

IARC. 1987. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. World Health Organization, Suppl. 7, Lyon. 56pp.

IARC. 1993. Mercury and mercury compounds. IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, volume 58, Lyon, pp. 239-345.

IPCS (International Program on Chemical Safety). 1985. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. *Environmental Health Criteria*, 51, World Health Organization, Geneva. 208pp.

Ishidate, M. Jr., M. C. Harnois et T. Sofuni. 1988. A comparative analysis of data on the

clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutation Res.* 195: 151-213.

Itano, K., S. Kawai, N. Miyazaki, R. Tatsukawa et T. Fujiyama. 1984. Body burden and distribution of mercury and selenium in striped dolphins. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1117-1121.

Ivett, J. L. et R. R. Tice. 1982. Average generation time: a new method of analysis and quantification of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4: 358.

Iwata, H., S. Tanabe, N. Sakai et R. Tatsukawa. 1993. Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1080-1098.

IWC (International Whaling Commission). 1992. Report of the sub-committee on small cetaceans. *Rep. Int. Whal. Comm.* 42: 178-734.

Jenssen, D. et C. Ramel. 1980. The micronucleus test as part of a short term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutation Res.* 75: 191-202.

Jenssen, S. et A. Jernelöv. 1969. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 223: 753-754.

- Jenssen, B. M. 1996. An overview of exposure to, and effects of, petroleum oil and organochlorine pollution in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Sci. Tot. Environ.* 186: 109-118.
- Kato, H. 1974. Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res.* 85: 239-247.
- Katona, S. K., V. Rough et D. T. Richardson. 1983. A field guide to the whales, porpoises and seals of the gulf of Maine and eastern Canada. Charles Scribner's Sons, Macmillan Publishing Company, NY, NY. 255pp.
- Kelly-Garvet, F. et M. S. Legator. 1973. Cytogenetic and mutagenic effects of DDT and DDE in a Chinese hamster cell line. *Mutation Res.* 17: 223-229.
- Kim, J. E. 1983. Seals of the world. Deuxième édition, Natural History Museum Publications, Cornell University Press, Ithaca, NY, NY. 240pp.
- King, C. M., E. S. Gillepsie, P. G. McKenna et Y. A. Barnett. 1994. An investigation of mutation as a function of age in humans. *Mutation Res.* 316: 79-90.
- Kim, P. M. et P. G. Wells. 1995. Mechanism of benzo[*a*]pyrene-induced micronucleus formation in cultured skin fibroblasts from Wistar rats. *Toxicologist* 14: 223.

- Kingsley, M. C. S. 1993. Census, trend, and status of the St. Lawrence beluga whale population in 1992. *Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1938: 17pp.
- Kingsley, M. C. S. 1996. Population index estimate for the belugas of the St. Lawrence in 1995. *Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2117: 24pp.
- Khalil M. F., J. Labbé, S. Lantagne, A.C. Horth et M. Arnac. 1984. Les organochlorés dans l'estuaire du St-Laurent. *Sci. Techn. Eau.* 17: 73-75.
- Koos, B. J. et L. D. Longo. 1976. Mercury toxicity in the pregnant woman, fetus and newborn infant. *Am. J. Obstet. Gynec.* 126: 390-409.
- Kuehl, D.W., R. Haebler et C. Potter. 1991. Chemical residues in dolphins from the U.S. Atlantic coast including Atlantic bottlenose obtained during the 1987/88 mass mortality. *Chemosphere* 22: 1071-1084.
- Lahvis, G.P., R.S. Wells, D. Casper et C.S. Via. 1993. In-vitro lymphocyte response of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): Mitogen-induced proliferation. *Mar. Environ. Res.* 35: 115-119.
- Lambert, B., K. Hansson, J. Lindstein, M. Sten et B. Werelius. 1976. Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas* 83: 163-174.

- Larsen, K.D. et S. M. Jalal. 1974. DDT induced chromosome mutations in mice - Further testing. *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 491-497.
- Lasorsa, B. et S. Allen-Gil. 1995. The methyl-mercury to total mercury ratio in selected marine, freshwater, and terrestrial organisms. *Water Air Soil Pollut.* 80: 905-913.
- Latt, S. A. 1974. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* 185: 74-76.
- Latt, S. A., J. Allen, S. E. Bloom, A. Carrano, E. Falke, D. Kram, E. Schneider, R. Schreck, R. Tice, B. Whitfield et S. Wolff. 1981. Sister-chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 87: 17-62.
- Lawrence, D. A. 1993. Immunotoxicity of heavy metals. Crisp Data Base of the National Institute of Health, 94-ES03179-11.
- LeBoeuf, B. J. et M. L. Bonnell. 1971. DDT in California sea lions. *Nature* 234: 108-110.
- Leonard, A., G. Decat et L. Fabry. 1982. The lymphocytes of small mammals. A model for research in cytogenetics? *Mutation Res.* 95: 31-44.
- Leonard, A., P. Jacquet et R. R. Lauwerys. 1983. Mutagenicity and teratogenicity of

- mercury compounds. *Mutation Res.* 114: 1-18.
- Leonard, A. 1990. *Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques*. Masson Éditeur, Paris.
- Lessa, J. M. M., W. Berçak, M. Nazareth Rabello, C. A. B. Pereika et M. T. Ungaro. 1976. Cytogenetic study of DDT on human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Res.* 40: 131-138.
- Littlefield, L. G., A. M. Sayer et E. L. Fromer. 1989. Comparison of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis* 4: 265-270.
- Lugo, M. H., H. S. Rauchfuss, H. R. Zakour, J. W. Allen et J. C. Hozier. 1989. Evidence for chromosomal replicons as units of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 98: 69-76.
- Lum, K. R. K., L. E. Kaiser et M. E. Comba. 1987. Export of mirex from Lake Ontario to the St. Lawrence estuary. *Sci. Tot. Environ.* 67: 41-51.
- Mace, M. L. Jr., Y. Daskal et N. Wray. 1978. Scanning-electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Res.* 52: 199-206.
- Mackay D. 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 16: 274-

276.

Mahr, U. et H. G. Miltenburger. 1976. The effect of insecticides on Chinese hamster cell cultures. *Mutation Res.* 40: 107-118.

Majumdar, S. K., H. A. Kopelman et M. J. Schnitman. 1976. Dieldrin-induced chromosome damage in mouse bone-marrow and WI-38 human lung cells. *J. Hered.* 67: 303-307.

Mamber, S. W., V. Bryson et S. E. Katz. 1984. Evaluation of the *Escherichia coli* K12 inductest for detection of potentiel chemical carcinogens. *Mutation Res.* 130: 141-151.

Mansfield, A. W. 1966. The grey seal in eastern Canada. *Can. Audubon Mag.* 28: 161-166.

Markaryan, D. S. 1966. Cytogenetic effect of some chlororganic insecticides on the nuclei of mouse bone marrow cells. *Genetika* 1: 132-137.

Maron, D. M. et B. N. Ames. 1984. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Dans: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, deuxième édition, B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols et C. Ramel (éditeurs), Elsevier Science Publishers, BV, pp. 92-141.

Martel, L., M. J. Gagnon, R. Massé, A. Leclerc et L. Tremblay. 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Saguenay Fjord, Canada. *Bull. Environ. Contam.*

Toxicol. 37: 133-140.

Mårtenssen, P. E., E. S. Nordøy et A. S. Blix. 1994. Digestibility of crustaceans and capelin in harp seals (*Phoca groenlandicus*). Mar. Mamm. Sci. 10: 325-331.

Martin, A. R. et T. G. Smith. 1992. Deep diving in wild, free-ranging beluga whales, *Delphinapterus leucas*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 462-466.

Martineau D., P. Béland, C. Desjardins et A. Lagacé. 1987. Concentrations of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence estuary, Québec, Canada. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16: 137-147.

Martineau, D., A. Lagacé, P. Béland, R. Higgins, D. Armstrong et L. R. Shugart. 1988. Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St-Lawrence estuary, Québec, Canada. J. Comp. Path. 98: 287-311.

Martineau, D., S. DeGuise, M. Fournier, L. Shugart, C. Girard, A. Lagacé et P. Béland. 1994. Pathology and toxicology of beluga whales from the St. Lawrence estuary, Québec, Canada. Past, present and future. Sci. Tot. Environ. 154: 201-215.

Martineau, D., S. Lair, S. DeGuise et P. Béland. Cancer in cetaceans, a potential biomarker of environmental contamination. Rep. Int. Whal. Comm. (in press).

Martoja, R. et J.-P. Berry. 1980. Identification of tiemannite as a probable product of demethylation of mercury by selenium in cetaceans. A complement to the scheme of the biological cycle of mercury. *Vie Milieu* 30: 7-10.

Marvin, C. H., L. Allan, B. E. McCarry et D. W. Bryant. 1993. Chemico/biological investigations of contaminated sediments in western lake Ontario. *Environ. Molec. Mutagen.* 22: 61-70.

Matsumura F. 1985. Toxicology of insecticides. Deuxième édition, Plenum Press, NY, NY, pp. 233-237.

Mead, J. G. et C. W. Potter. 1990. Natural history of bottlenose dolphins along the central Atlantic coast of the United States. Dans: *The bottlenose dolphin*, S. Leatherwood and R. R. Reeves (éditeurs), Academic Press, San Diego, CA, pp. 165-195.

Melnikov N. N., F. A. Gunther, J. D. Gunther and R. L. Busbey. 1971. Chemistry of pesticides. *Resid. Rev.* 36: (V.) 42-66 and (VI.) 67-77.

Meisner, L. F., B. Roloff, L. Sargent et H. Pitot. 1992. Interactive cytogenetic effects on rat bone-marrow due to chronic ingestion of 2,5,2',5' and 3,4,3',4' PCBs. *Mutation Res.* 283: 179-183.

- Meister, R. T. 1987. Farm chemical handbook. Meister Publishing Company, Willoughby, OH.
- Metcalfé C.D. 1990. Analysis of persistent organic contaminants in marine samples from Barbados. Rapport pour le laboratoire marin Bellairs de l'université McGill. 21pp.
- Michaud, R. 1993. Distribution estivale du béluga du St. Laurent: synthèse 1986 à 1992. Rap. Tech. Can. Sci. Halieut. Aquat. 1906: 28 pp.
- Miller, C. T., Z. Zawidzka, E. Nagy et S. M. Charbonneau. 1979. Indicators of genetic toxicity in leucocytes and granulocytic precursors after chronic methylmercury ingestion by cats. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21: 296-303.
- Mitchell, I. G., T. R. Lambert, M. Burden, J. Sunderland, R. L. Porter et J. B. Carlton. 1995. Is polyploidy an important genotoxic lesion? Mutagenesis 10: 79-83.
- Mitelman, F. 1994. Catalog of chromosome aberrations in cancer. Cinquième édition, Wiley, NY, NY.
- Mitra, S. 1986. Mercury in the ecosystem. Its dispersion and pollution today. Trans Tech Publications Ltd, Switzerland.

- Miura, K. et N. Imura. 1987. Mechanism of methylmercury cytotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 18: 161-188.
- Miyazaki T., T. Yamagishi and M. Matsumoto. 1985. Isolation and structure elucidation of some components of technical grade chlordane. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 475-483.
- Mohn, R. et W. D. Bowen. 1996. Grey seal predation on the eastern Scotian Shelf: modelling the impact on Atlantic cod. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 2722-2738.
- Moore, R. C. et M. A. Bender. 1990. Time sequence of events leading to chromosomal aberration formation. *Environ. Molec. Mutag.* 22: 208-213.
- Morimoto, K., S. Iijima et A. Koizumi. 1982. Selenite prevents induction of sister-chromatid exchanges by methyl mercury and mercuric chloride in human whole-blood cultures. *Mutation Res.* 102: 183-192.
- Mourelle M., M. Garcia et C. Aguilar. 1985. Adenosine triphosphate activities in plasma liver membranes of rats treated with DDT and toxaphene. *J. Appl. Toxicol.* 5: 39-41.
- Muir, D. C. G., C. A. Ford, R. E. A. Stewart, T. G. Smith, R. F. Addison, M. E. Zinck et P. Béland. 1990. Organochlorine contaminants in belugas, *Delphinapterus leucas*, from

- Canadian waters. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 224: 165-190.
- Muir, D. C. G., C. A. Ford, B. Rosenberg, R. J. Norstrom, M. Simon et P. Béland. 1996. Persistent organochlorines in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence river estuary. I. Concentrations and patterns of specific PCBs, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -dibenzofurans. *Environ. Pollut.* 93: 219-234.
- Munson, L., N. Calzada, S. Kennedy et T. B. Sorenson. 1998. Lutenized ovarian cysts in Mediterranean striped dolphins. *J. Wildl. Dis.* 34: 656-660.
- Natarajan, A. T. et G. Obe. 1982. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. Dans: *Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology*, J. A. Heddle (éditeur), Academic Press, NY, NY, pp. 171-213.
- Natarajan, A. T. 1984. Origin and significance of chromosomal aberrations. Dans: *Mutations in man*, G. Obe (éditeur), pp. 156-176.
- Nesnow, S., J. A. Ross, G. D. Stoner et M. J. Mass. 1995. Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice. *Toxicology* 105: 403-413.
- Nielsen, J. 1995. Immunological and hematological parameters in captive harbor seals

(*Phoca vitulina*). Mar. Mamm. Sci. 11: 314-323.

Nishi, Y., M. M. Hasegawa, M. Takemoti, Y. Ohkawa et N. INui. 1984. Comparison of 6-thioguanine-resistant mutation and sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells with forty chemical and physical agents. Cancer Res. 3270-3279.

Nomeir, A. A. et N. P. Hajjar. 1987. Metabolism of chlordane compounds. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 100: 1-22.

Nordic Study Group. 1990. A nordic prospective study on the relationship between peripheral lymphocyte chromosome damage and cancer morbidity in occupational groups. Dans: Mutation in the Environment, Part C: Somatic and heritable mutation, adduction and epidemiology, Wiley-Liss, NY, NY, pp. 357-366.

NRCC (National Research Council Canada). 1974. Chlordane: its effects on Canadian ecosystems and its chemistry. NRCC 14094, NRCC/CNRC, Ottawa.

Ockey, C. H. 1980. Autoradiographic evidence of differential loss of BudR-substituted DNA after UV exposure in FPG harlequin staining. Exp. Cell Res. 125: 511-514.

Oehme, M. et B. Ottar. 1984. The long range transport of polychlorinated hydrocarbons to the arctic. Geophys. Res. Letters 11: 1133-1136.

- Oehme, M., M. Schlabach, R. Kallenborn et J. E. Haugen. Sources and pathways of persistent polychlorinated pollutants to remote areas of the north Atlantic and levels in marine food chain: A research update. *Sci. Tot. Environ.* 186: 13-24.
- Olsson, M., B. Karlsson et E. Ahnland. 1994. Diseases and environmental contaminants in seals from the Baltic and Swedish west coast. *Sci. Tot. Environ.* 154: 217-227.
- Ogura, H., T. Takeuchi et K. Morimoto. 1996. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutation Res.* 340: 175-182.
- Önfelt, A. 1983. Spindle disturbances in mammalian cells. I. Changes in the quantity of free sulfhydryl groups in relation to survival and c-mitosis in V79 Chinese hamster cells after treatment with colcemid, diamide, carbaryl and methyl mercury. *Chem.-Biol. Interact.* 46: 201-217.
- Önfelt, A. 1986. Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers. *Mutation Res.* 168: 249-300.
- Oshimura, M., et C. Barrett. 1986. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells:

- mechanisms and biological significance in cancer. *Environ. Mutagen.* 8: 129-159.
- Painter, R. B. 1980. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 70: 337-341.
- Palmer, K.A., S. Green et M.S. Legator. 1972. Cytogenetic effects of DDT and derivatives of DDT in a cultured mammalian cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22: 355-364.
- Palmisano, F., N. Cardellicchio et P. G. Zambonin. 1995. Speciation of mercury in dolphin liver: A two-stage mechanism for the demethylation accumulation process and role of selenium. *Mar. Environ. Res.* 40: 109-121.
- Papoulias, D. M., et D. R. Buckler. 1996. Mutagenicity of Great Lakes sediments. *J. Great Lakes Res.* 22: 591-601.
- Parry, J. M., E. M. Parry, R. Bourner, A. Doherty, S. Ellard, J. O'Donovan, B. Hoebee, J. M. de Stoppelaar, G. R. Mohn, A. Önfelt, A. Renglin, N. Shultz, C. Söderpalm-Berndes, K. G. Jensen, M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, P. van Hummelen, F. Degrassi, A. Antoccia, D. Cimini, M. Izzo, C. Tanzarella, I.-D. Adler, U. Kliesch, G. Schriever-Schwemmer, P. Gasser, R. Crebelli, A. Cadere, A. Andreoli, R. Benigni, P. Leopardi, F. Marcon, Z. Zinjo, A. T. Natarajan, J. J. W. A. Beoi, A. Kappas, G. Voutsinas, F. E. Zarani, A. Patrinely, F. Pachierotti, C. Tiveron and P. Hess. 1996. The detection and evaluation of aneugenic

- chemicals. *Mutation Res.* 353: 11-46.
- Peakall, D. B. 1970. Pesticides and the reproduction of birds. *Sci. Amer.* 222: 72-78.
- Pelkonen, O., et D. W. Nebert. 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34: 189-222.
- Pelletier, E., P. Béland et N. Blouin. 1990. Développement d'une méthode d'évaluation de l'impact des HAP sur les organismes aquatiques. Rept. INESL, Environnement Canada, Montreal, # KA313-9-3949. 22pp.
- Perera, F.P., K. Hemminki, E. Gryzbowska, G. Motykiewicz, J. Michalska, R.M. Santella, T.-L. Young, C. Dickey, P. Brandt-Rauf, I. DeVivo, W. Blaner, W.-Y. Tsai et M. Chorazy. 1992. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature* 360: 256-258.
- Perrin, W. F. et S. B. Reilly. 1984. Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae. *Rep. Int. Whal. Comm. Spec. Iss.* 6: 97-133.
- Perry, P. E., et S. Wolff. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid exchanges. *Nature* 251:156-158.

- Perry, P. E. et H. J. Evans. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.
- Perry, P. E. et E. J. Thompson. 1984. The methodology of sister chromatid exchange. Dans: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, deuxième édition, B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols et C. Ramel (éditeurs), Elsevier Science Publishers BV, pp.495-529.
- Pham, T., K. Lum et C. Lemieux. 1993. The occurrence, distribution, and sources of DDT in the St. Lawrence river, Québec (Canada). *Chemosphere* 26: 1595-1606.
- Pippard, L. 1985. Status of the St. Lawrence river population of beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Can. Field. Naturalist* 99: 438-450.
- Poirier, M. C., et F. A. Beland. 1992. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: Implications for DNA adduct-based human cancer risk assessments. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 749-755.
- Popescu, N. C., S. C. Amsbaugh et J. A. DiPaolo. 1981. Relationship of carcinogen-induced sister chromatid exchange and neoplastic cell transformation. *Intl. J. Cancer* 28: 71-78.
- Quémaraïs, B., C. Lemieux et K. R. Lum. 1994. Concentrations and sources of PCBs and

organochlorine pesticides in the St. Lawrence river (Canada) and its tributaries. *Chemosphere* 29: 591-610.

Rabello, M. N., W. Beçak, W. F. de Almeida, P. Pigati, M. T. Ungaro, T. Murata et C. A. B. Perera. 1975. Cytogenetic study on individuals occupationally exposed to DDT. *Mutation Res.* 28: 449-454.

Ramalho, A., I. Sunjevaric et A. T. Natarajan. 1988. Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray induced chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes: Comparison of two methods. *Mutation Res.* 207: 141-146.

Rapaport R. A., N. R. Durban, P. D. Capel, J. E. Baker, B. B. Looney, S. J. Eisenreich et E. Gorham. 1985. "New" DDT inputs in North America: atmospheric deposition. *Chemosphere* 14: 1167-1173.

Read, A. J., R. S. Wells, A. A. Hohn et M. D. Scott. 1993. Patterns of growth in wild bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *J. Zool. Lond.* 231: 107-123.

Reddy, T. V., J. A. Stober, G. R. Olson et F. B. Daniel. 1991. Induction of nuclear anomalies in the gastrointestinal tract by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Lett.* 56: 215-224.

Reeves, R. R. et E. Michell. 1984. Catch history and initial population of white whales (*Delphinapterus leucas*) in the river and gulf of St-Lawrence, eastern Canada. *Naturaliste Can.* 111: 63-121.

Reifferschild, G. et J. Heil. 1996. Validation of the SOS/*umu* test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Res.* 369: 129-145.

Reuber, M. D. 1979. Carcinogenicity of toxaphene: A review. *J. Toxicol. Environ. Health* 5: 729-748.

Ribas, G., N. Xamena, A. Creus et R. Marcos. 1996. Sister-chromatid exchanges (SCE) induction by inhibitors of DNA topoisomerases in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 368: 205-211.

Richard, F., M. Muleris et B. Dutrillaux. 1994. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutation Research* 316:1-7.

Rieger, R., M. M. Green et A. Michaelis. 1991. Glossary of genetics, classical and molecular, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, N-Y, pp. 96.

Ross, J. A., G. B. Nelson, K. H. Wilson, J. R. Rabinowitz, A. Galati, G. D. Stoner, S.

Nesnow et M. J. Mass. 1995. Adenomas induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mouse lung correlate with time-integrated DNA adduct levels. *Cancer Res.* 55: 1039-1044.

Rubeš, J. 1987. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in swine. *Mutation Res.* 191: 105-109.

Rubeš, J., L. Bokovec, Z. Hořínová, J. Urbanová, I. Proroková et L. Kuliková. 1992. Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. *Mutation Res.* 283: 199-210.

Rubeš, J., Z. Pokorná, L. Bokovec, J. Urbanová et V. Strnadová. 1997. Dairy cattle as a bioindicator of exposure to genotoxic substances in a heavily polluted area of Northern Bohemia. *Mutation Res.* 391: 57-70.

Rudd, N. L., D. I. Hoar, C.L. Greentree, L. S. Dimnik et U. G. G. Hennig. 1988. Micronucleus assay in human fibroblasts: a measure of spontaneous chromosomal instability and mutagen hypersensitivity. *Environ. Mol. Mutagen.* 12: 3-13.

Rudd, N. L., S. E. Williams, M. Evans, U. G. G. Hennig et D. I. Hoar. 1991. Kinetochore analysis of micronuclei allows insights into the actions of colcemid and mitomycin C. *Mutation Res.* 261: 57-68.

- Safe, S. 1989. Polychlorinated biphenyls (PCBs): mutagenicity and carcinogenicity. *Mutation Res.* 220: 31-47.
- Sakar D., A. Sharma et G. Talukder. 1993. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow. *Mutation Res.* 301: 33-38.
- Saleh, M. A. 1987. Negative ion chemical ionization mass spectrometry of toxaphene. Dans: *Application of new mass spectrometry techniques in pesticide chemistry*, J. D. Rosen (éditeur), John Wiley and Sons, NY, NY, pp. 34-41.
- Saleh, M. A. 1991. Toxaphene: chemistry, biochemistry, toxicity and environmental fate. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 118: 1-76.
- Samosh, L. V. 1974. Chromosome aberration and character of satellite associations after accidental exposure of the humans to polychlorocamphene. *Tsitol. Genet.* 8: 24-27.
- Sandberg, A. A. 1991. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. *Mutation Res.* 247: 231-240.
- Sargent, L., B. Roloff et L. Meisner. 1989. *In vitro* chromosome damage due to PCB interactions. *Mutation Res.* 224: 79-88.

Savage, J. R. K. 1975. Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 12: 103-122.

Savage, J. R. K. 1990. Mechanisms of chromosome aberrations. Dans: *Mutation in the Environment, Part B*, M. L. Mendelsohn and R. J. Albertini (éditeurs), Wiley-Liss, Inc., NY, NY, pp. 385-396.

Savage, J. R. K. 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environ. Molec. Mutag.* 22: 198-207.

Sax, K. 1938. Chromosomal aberrations induced by X-rays. *Genetics* 23: 494-516.

Scarfì, M. R., M. B. Lioi, D. Di Berardino, O. Zeni, A. M. R. Coviello et D. Matassino. 1993. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in bovine lymphocytes. *Mutation Res.* 289: 291-295.

Schubert, I. et A. Meister. 1979. Possible connections between the modes of origination of sister chromatid exchanges (SCEs) and chromatid aberrations. *Stud. Biophys.* 76: 211-217.

Schuler, M., D. S. Rupa and D. A. Eastmond. 1997. a critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vivo. *Mutation Res.* 392: 81-95.

Schultz, N. et A. Önfelt. 1994. Video time-elapse study of mitosis in binucleate V79 cells: Chromosome segregation and cleavage. *Mutagenesis* 9: 117-123.

Scott, M. D., R. S. Wells et A. B. Irvine. 1990. A long term study of bottlenose dolphins on the west coast of Florida. Dans: *The bottlenose dolphin*, S. Leatherwood and R. R. Reeves (éditeurs), Academic Press, San Diego, CA, pp. 235-244.

Sergeant, D. E. 1973. Biology of white whales (*Delphinapterus leucas*) in western Hudson Bay. *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 1065-1090.

Sergeant, D. E. 1986. Present status of white whales, *Delphinapterus leucas*, in the St. Lawrence estuary. *Naturaliste Can.* 113: 61-81.

Sergeant, D. E. et W. Hoek. 1988. An update of the status of white whales, *Delphinapterus leucas*, in the St. Lawrence estuary, Canada. *Biol. Conserv.* 45: 287-302.

Setlow, R. B. 1978. Repair deficient human disorders and cancer. *Nature* 271: 713-717.

Sharma, T. et B. C. Das. 1986. Higher incidence of spontaneous sister-chromatid exchanges (SCEs) and X-ray-induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes during pregnancy. *Mutation Res.* 174: 27-33.

- Sheid, N. et H. Traut. 1978. Ultraviolet-microscopical studies on achromatic lesions (gaps) induced by X-rays in the chromosomes of *Vicia faba*. *Mutation Res.* 10: 159-161.
- Shelton, P. A., W. G. Warren et G. B. Stenson. 1995. Quantifying some of the major sources of uncertainty associated with estimates of harp seal prey consumption. Part II: Uncertainty in consumption associated with population size, residency, energy requirement and diet. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* 22: 303-315.
- Shelton, P. A., G. B. Stenson, B. L. Sjare et W. Warren. 1996. Model estimates of harp seals numbers-at-age for the northwest Atlantic. *NAFO Sci. Counc. Studies* 26: 1-14.
- Skerfving, S., K. Hansson, C. Mangs, J. Lindsten et N. Ryman. 1974. Methylmercury-induced chromosome damage in man. *Environ. Res.* 7: 83-98.
- Snyder, R. D. 1988. Role of active oxygen species in metal induced DNA breakage in human diploid fibroblasts. *Mutation Res.* 193: 237-246.
- Sobti, R. C., A. Krishan et J. Davies. 1983. Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro*. II. Organochlorine pesticides. *Arch. Toxicol.* 52: 221-231.
- Solomon, E., J. Borrow et A. Goddard. 1991. Chromosome aberrations and cancer.

Science 254: 1153-1160.

Spindler, M. 1983. DDT: Health aspects in relation to man and risk/benefit assessment based upon thereupon. Resid. Rev. 90: 1-34.

Springer, D. L., D. B. Mann, D. A. Dankovic, B. L. Thomas, C. W. Wright et D. D. Mahlum. 1989. Influences of complex organic mixtures of tumor-initiating activity, DNA binding and adducts of benzo[*a*]pyrene. Carcinogenesis 10: 131-137.

Steinel, H. H., A. Arlauskas et R. S. U. Baker. 1990. SCE induction and cell-cycle delay by toxaphene. Mutation Res. 230: 29-33.

Stenson, G. B., B. Sjare, W. G. Warren, R. A. Myers, M. O. Hamill et M. C. S. Kingsley. 1996. 1994 pup production of the northwest Atlantic harp seal, *Phoca groenlandicus*. NAFO Sci. Counc. Studies 26: 47-61.

Stenson, G. B., M. O. Hamill et J. W. Lawson. 1997. Predation by harp seals in Atlantic Canada: Preliminary consumption estimates for arctic cod, capelin, and Atlantic cod. J. Northw. Atl. Fish. Sci. 22: 137-154.

Stetka, D. G. et A. V. Carrano. 1977. The interaction of Hoescht 33258 and BrdU substituted DNA in the formation of sister chromatid exchanges. Chromosoma 36: 21-31.

Stetka, D. G., J. L. Minkler et A. V. Carrano. 1978. Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister-chromatid exchange in lymphocytes of animals exposed to mitomycin-C. *Mutation Res.* 51: 383-396.

Stewart, R. E. A. et D. M. Lavigne. 1980. Neonatal growth of northwest Atlantic harp seals, *Phoca groenlandicus*. *J. Mammal* 61: 670-680.

Stobo, W. T., B. Beck et J. K. Horne. 1990. Seasonal movements of grey seals (*Halichoerus grypus*) in the northwest Atlantic. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 222: 199-213.

Surrallés, J., E. Carbonell, R. Marcos, F. Degrassi, A. Antoccia et C. Tanzarella. 1992. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7: 407-410.

Surrallés, J., N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa et R. Marcos. 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 341:169-184.

Sylvestre, A., K. W. Kuntz et N. D. Warry. 1987. Water quality at the inlet to the St. Lawrence river, 1977 to 1983. *Inland Waters/Lands Directorate Tech. Bull.* 142: 874-879.

Tanabe, S., R. Tatsukawa, H. Tanaka, K. Maruyama, N. Miyazaki et T. Fujiyama. 1981.

Distribution and total burdens of chlorinated hydrocarbons in bodies of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Agric. Biol. Chem.* 45: 2569-2578.

Taylor, J. H., P. S. Woods et W. L. Hugues. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43: 122-138.

Thompson, D. R. 1990. Metals in marine vertebrates. Dans: *Heavy Metals in the Environment*, R. W. Furness et P. S. Rainbow (éditeurs), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 143-182.

Thompson, E. J. et P. E. Parry. 1988. The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 3: 415-418.

Tice, R. R. et R. B. Setlow. 1985. DNA repair and replication in aging organisms and cells. Dans: *Handbook of the Biology of Aging*, deuxième édition, C.E. Finch et E.L. Schneider (éditeurs), Van Nostrand Reinhold, NY, NY, pp. 173-224..

Triolo, A. J., W. R. Lang, J. M. Coon, D. Lindstrom et L. H. Daniel. 1982. Effect of the insecticide toxaphene and cabaryl on induction of lung tumors by benzo[a]pyrene in the mouse. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 637-649.

Tucker, J. D., A. Auletta, M. C. Cimino, K. L. Dearfield, D. Jacobson-Kram, R. R. Tice et A. V. Carrano. 1993. Sister chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutation Res.* 297: 101-180.

Tucker, J. D. et R. J. Preston. 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Res.* 365: 147-159.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1985a. Draft health effects criteria document for toxaphene. USEPA Office of Drinking Water, Washington, DC.

USEPA. 1985b. Draft health effects criteria document for chlordane. USEPA Office of Drinking Water, Washington, DC.

Vahter, M., N. K. Mottet, L. Friberg, B. Lind, D. D. Shen et T. Burbacher. 1994. Speciation of mercury in the primate blood and brain following long-term exposure to methylmercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124: 221-229.

Vedder, J. M., J. W. Newman, W. M. Jarman et R. S. Wells. 1993. Preliminary study of contaminant levels in blood and milk of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) on the west coast of Florida. Présenté à la dixième conférence biannuelle sur la biologie des mammifères marins, Galveston, TX, 11-15 novembre 1993.

Verschaeve, L, M. Kirsch-Volders, L. Hens et C. Susanne. 1985. Comparative *in vitro* studies in mercury-exposed human lymphocytes. *Mutation Res.* 157: 221-226.

Vettorazi G. 1975. State of the art of the toxicological evaluation carried out by the joint FAO/WHO Expert Committee on pesticide residues. I. Organohalogenated pesticides used in public health and agriculture. *Resid. Rev.* 56: 113-134.

Vian, L., N. Bichet et D. Gouy. 1993. The *in vitro* micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutation Res.* 291: 93-102.

Vienneau, D. S., U. DeBoni et P. G. Wells. 1995. Potential genoprotective role for UDP-glucuronyltransferases in chemical carcinogenesis: initiation of micronuclei by benzo[*a*]pyrene and benzo[*e*]pyrene in UDP-glucuronyltransferase-deficient cultured rat skin fibroblasts. *Cancer Res.* 55: 1045-1051.

Vladykov, V. D. 1946. Etudes sur les mammifères aquatiques. IV. Nourriture du marsouin blanc ou béluga (*Delphinapterus leucas*) du fleuve St-Laurent. *Contrib. Dep. Pêch. Qué.* 14: 1-194.

Voldner, E. C. et Y. F. Li. 1993. Global usage of toxaphene. *Chemosphere* 27: 2073-2078.

Wagemann, R., R. E. A. Stewart, P. Béland et C. Desjardins. 1990. Heavy metals and

selenium in tissues of beluga whales, *Delphinapterus leucas*, from the Canadian Arctic and the St. Lawrence estuary. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 224: 191-206.

Wakata, A. et M. S. Sasaki. 1987. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutation Res.* 190: 51-57.

Walker, C. H. 1975. Variation in the intake and elimination of pollutants. Dans: *Organochlorine Insecticides: persistent Organic Pollutants*, F. Moriarty (éditeur), Academic Press, NY, NY, pp. 73-130.

Ware, G. W. (éditeur en chef). 1988. Chlordane. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 104: 47-62.

Warshawsky, D., G.K. Livingston, M. Fonouni-Fard et K. LaDow. 1995. Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes. *Environ. Molec. Mutag.* 26: 109-118.

Wells, R. S., M. D. Scott et A. B. Irvine. 1987. The social structure of free-ranging bottlenose dolphins. Dans: *Current Mammalogy*, volume 1, H. H. Ganoways (éditeur), Plenum Press, NY et Londres, pp. 247-305.

Wells, R. S. et M. D. Scott. Sous presse. Bottlenose dolphin. Dans: Handbook of Marine Mammals, volume 6, The Second Book of Dolphins and Porpoises, S. H. Ridgway et R. J. Harrison (éditeurs), chapitre 7.

White, P. A., C. Blaise et J. B. Rasmussen. 1997. Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest. *Mutation Res.* 392: 277-300.

WHO (World Health Organization). 1984. Chlordane. *Environmental Health Criteria* 34, Geneva.

Winker, N., P. Weniger, W. Klein, E. Ott, F. Kocsis, B. Shoket et K. Korpet. 1995. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure damage using different methods in laboratory animals. *J. Appl. Toxicol.* 15: 59-62.

Wolff, S. 1977. Sister chromatid exchange. *Annu. Rev. Genet.* 11: 183-201.

Yamada, H., T. Miyahara, H. Kozuka, T. Matsushashi et Y. F. Sasaki. 1993. Potentiating effects of organomercuries on clastogen-induced chromosome aberrations in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res* 290: 281-291.

Yunis, J. J. 1983. The chromosomal basis of neoplasia. *Science* 221: 227-236.

Zijno, A., P. Leopardi, F. Marcon et R. Crebelli. 1996. Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated cells. *Chromosoma* 104: 461-467.

Zúñiga, G., O. Torres-Bugarín, M. P. Ramírez-Muñoz, A. Ramos, E. Fanti-Rodríguez, E. Portilla, D. García-Martínez, J. M. Cantú, M. P. Gallegos-Arreola et J. Sánchez-Corona. 1996. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Res.* 369: 123-127.

ANNEXE 1

AUTRES ÉTUDES EFFECTUÉES LORS DE CET OUVRAGE

Cette thèse portait initialement sur l'essai clonal HPRT⁻ pour l'évaluation des effets mutagènes des contaminants environnementaux dans les lymphocytes de bélugas (volet *in vitro*) et pour l'évaluation des fréquences de mutation somatique HPRT⁻ dans les lymphocytes de béluga de l'arctique et du St-Laurent (volet *in vivo*). Cependant, ce projet a dû être abrogé en raison des difficultés techniques insurmontables dans les délais limités d'un PhD. Ce projet fut réorienté avec succès vers l'application de plusieurs techniques plus simples et rapides, tels que les tests de MN, d'ECS et d'AC, pour la détection de dommages à l'ADN au niveau chromosomique chez les bélugas et autres espèces de mammifères marins.

Des études *in vitro* ont aussi été effectuées avec l'essai Comet pour évaluer les brisures dans les brins d'ADN par le MeHg et le toxaphène dans les lymphocytes du sang de trois bélugas de l'arctique. Les résultats obtenus avec l'essai Comet ne sont pas présentés dans cette thèse mais seront publiés comme article dans une revue avec comité de lecture prochainement.

Les fibroblastes de bélugas de l'arctique et du St-Laurent ont aussi été utilisés pour trois projets de collaboration avec des chercheurs d'autres institutions: 1) L'étude des mutations dans le gène de la fibriline de fibroblastes d'un béluga du St-Laurent mort d'un anévrisme coronaire, effectuée par la technique d'immunohistochimie appliquée à des

cultures de fibroblastes fixées *in situ* provenant de cet animal et de d'autres bélugas du St-Laurent servant de contrôles négatifs; 2) L'étude des mutations dans le gène *p53* chez les bélugas du St-Laurent, effectuée par l'analyse moléculaire de l'ADN et de l'ARN extraits de cultures de fibroblastes de différents bélugas; 3) L'étude de l'infection virale chez les cellules de bélugas, réalisée à l'aide de fibroblastes de différents bélugas de l'arctique et du St-Laurent. Dans l'avenir, les fibroblastes congelés pourront servir de banque de cellules pour d'autres projets expérimentaux.